

MIKROANALYTISCHE BESTIMMUNG VON JUVENILHORMONTITERN DER
HONIGBIENE

Hartwig Hagenguth

1979

MIKROANALYTISCHE BESTIMMUNG VON JUVENILHORMONTITERN DER
HONIGBIENE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Chemie und
Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Hartwig Hagenguth

aus

Gröna

1979



1. Referent: Prof. Dr. H. Rembold

2. Referent: Prof. Dr. R. Huisgen

Tag der mündlichen Prüfung: 19.7.1979

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, unter Anleitung von Prof. Dr. H. Rembold durchgeführt.

Frau Dr. B. Lanzrein, Bern, danke ich für die Durchführung der Galleria-Tests. Für wertvolle technische Assistenz bei den massenspektrometrischen Messungen bin ich Herrn J. Rascher und bei der Probenvorbereitung Frau D. Rascher zu Dank verpflichtet. Herrn Imkermeister G. Schmidt danke ich für die Aufzucht der Königinnen und Fräulein L. Steiner für die Reinschrift des Manuskripts.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Rembold, der die für die Durchführung der Arbeit notwendigen Mittel bereitgestellt hat. Zudem danke ich ihm herzlich für sein stetes Interesse und zahlreiche Diskussionen, die den Fortgang der Arbeit entscheidend beeinflußt haben.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551927_0071

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einführung und Ziel der Arbeit	4
2. Experimenteller Teil	10
2.1 Apparate	10
2.2 Reagenzien und Lösungsmittel	12
2.3 Chromatographische Methoden	13
2.3.1 Dünnschichtchromatographie	13
2.3.2 Hochdruckflüssigchromatographie	14
2.3.3 Gaschromatographie	17
2.3.4 Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie	18
2.3.5 Eichlösungen	19
2.4 Synthese von JH-Derivaten (Makromaßstab)	19
2.5 Sammeln des Bienenmaterials	24
2.6 Aufarbeitung von Bienenmaterial für JH-Bestimmungen	26
2.6.1 Extraktion von Insektenmaterial und Vorreinigung der Rohextrakte	26
2.6.2 Reinigung der lipidhaltigen Extrakte durch Dünnschichtchromatographie	28
2.6.3 Galleria-Wachs-Test	29
2.6.4 Derivatisierung und weitere Anreicherung von Juvenilhormonen aus biologischen Proben	30
2.6.4.1 Derivatisierung für Messungen mit dem ECD	30
2.6.4.2 Derivatisierung für den JH-Nachweis mit dem Massenspektrometer	33
2.7 Ausbeutebestimmung	34

	Seite
3. Allgemeiner Teil	36
3.1 Hochdruckflüssigchromatographie	36
3.1.1 Trennung hydrophiler organischer Säuren an Ionenaustauschern	37
3.1.1.1 Trennungen am Anionenaustauscher Aminex A 15	38
3.1.1.2 Trennungen am Anionenaustauscher AS-Pellionex SAX	45
3.1.2 Adsorptionschromatographie der Juvenilhormone und ihrer Derivate an Kieselgel	49
3.2 Derivatisierung von Juvenilhormonen	59
3.2.1 Darstellung von JH-10,11-bis-HFB-Estern	60
3.2.2 Umsetzung von Juvenilhormonen zu 10-HFB-11-methoxy-Derivaten	67
3.2.3 Reaktion der Juvenilhormone mit fluorierten Alkoholen	70
3.3 Gaschromatographische Bestimmung derivatisierter Juvenilhormone und Nachweis mit dem ECD	76
3.3.1 Nachweis der Dichlorbenzoate	77
3.3.2 Juvenilhormontiterbestimmung mit Hilfe der Heptafluorbutyrate	78
3.3.3 Empfindlichkeitsbestimmung der NFH-Derivate	86
3.4 Trennung von Juvenilhormon-NFH-Derivaten über Glaskapillarsäulen und massenspektrometrischer Nachweis juvenilhormonspezifischer Fragmente (SIM) im GC-Eluat	88
4. Modulation des Juvenilhormontiters in den beiden weiblichen Kasten der Honigbiene	101
4.1 Ergebnisse des Galleria-Tests	101

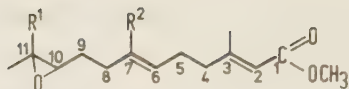
	Seite
4.2 Verlauf der Juvenilhormontiter nach chemisch-analytischen Daten	103
4.3 Diskussion der entwicklungsabhängigen und kastenspezifischen Modulation von Juvenilhormontitern	106
4.3.1 Die Entwicklungsabhängigkeit der Juvenilhormontiter	106
4.3.2 Die kastenspezifische Modulation der Juvenilhormontiter	108
5. Zusammenfassung	111
6. Literatur	113
7. Lebenslauf	118

1. EINFÜHRUNG UND ZIEL DER ARBEIT

Die beiden weiblichen Kasten der Honigbiene (Königin und Arbeiterin) besitzen das gleiche Erbgut. Für die Entwicklung einer frisch geschlüpften Larve zu der einen oder anderen Kaste ist allein der Futtersaft verantwortlich, den die Larven während der ersten drei Entwicklungsstadien erhalten¹.

Rembold² postulierte, daß im Weiselfuttersaft (Futtersaft in Königinnenzellen) eine oder auch mehrere Komponenten vorhanden sind, die die Entwicklung der Larve zu einer Königin induzieren und die er als *D e t e r m i n a t o r* bezeichnete. Dieses determinierende Prinzip zu kennen, wäre über die Bienen hinaus für die Insektenphysiologie von allgemeiner Bedeutung, wenn man davon ausgeht, daß die Bienenkönigin die normale weibliche Form ist, während die nicht fortpflanzungsfähige Arbeiterin eine Mangelvariante darstellt, entstanden durch das Fehlen wesentlicher Entwicklungsfaktoren - des Determinators - während der ersten drei Larvenstadien. Determinierendes Material (Material, das die Bildung von Königinnen stimuliert) war in den Ethanolextrakten und nach deren Chromatographie über Ionenaustauscher angereichert worden³. Um die dabei erhaltenen Fraktionen saurer Verbindungen weiter zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit Methoden entwickelt, die es erlauben, stark hydrophile organische Säuren mit der damals noch jungen Methode der Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) weiter aufzutrennen. Da sich herausstellte, daß diese Weiselfutterfraktionen die Determinationsrate im wesentlichen durch Kationen (Kalium/Natrium-Verhältnis) beeinflussen⁴, wurden diese Untersuchungen nicht weitergeführt.

Obwohl im Weiselfuttersaft keine Juvenilhormonaktivität nachgewiesen werden konnte⁵, hatten Wirtz und de Wilde 1973 postuliert, daß die Insekten-Juvenilhormone (JH) für die Entwicklung einer Larve zur Königin (Determination) verantwortlich seien. Einige wenige Untersuchungen über den JH-Titer in der Haemolympe von Larven beider Kasten⁵ und die Zunahme von Königinmerkmalen geschlüpfter Bienen nach Behandlung der Larven mit JH-I⁶ dienten als Grundlage für diese These. Für die Bestimmung der JH-Titer hatte man sich dabei des Galleriatests^{7,8,9} bedient (vgl. S. 7, 101). Rembold et al.¹⁰, die wie de Wilde Larven mit unterschiedlichen Dosen JH-I behandelt hatten, fanden in vitro neben einem determinierenden Effekt Mißbildungen, insbesondere der Augen. Unter diesen Voraussetzungen war es für die weitere Diskussion über den determinierenden Effekt der Juvenilhormone notwendig, erst einmal Art und Menge der in den verschiedenen Entwicklungsstadien der Biene vorkommenden Juvenilhormone zu bestimmen und mögliche Unterschiede im Titer der beiden Kasten festzustellen. Gleichzeitig sollten diese Untersuchungen einen Beitrag zu der Hypothese liefern, daß JH-I und evtl. JH-II das "juvenile Hormon" der Insekten sei und JH-III das gonadotrope^{11,12}. Die Juvenilhormone (Schema 1) sind Sesquiterpenoide, die sich vom Farnesensäuremethylester ableiten. Allen gemeinsam ist die 10,11-Epoxygruppierung. Sie unterscheiden sich nur in der Länge der Seitenketten an C-7 und C-11. Das JH-I [Methyl-(2E,6E)-(10R,11S)-10,11-epoxy-7-ethyl-3,11-dimethyl-2,6-tridecadienoat, Verbindung [1] in Schema 1] war 1967 von Rölller et al.¹³ aus Hyalophora cecropia L. isoliert und seine Struktur durch Synthese¹⁴ bewiesen worden.



- [1] $R^1 = R^2 = C_2H_5$ (JH-I)
 [2] $R^1 = C_2H_5$, $R^2 = CH_3$ (JH-II)
 [3] $R^1 = R^2 = CH_3$ (JH-III)

Schema 1

Vorher schon hatte Schmialek¹⁵ die juvenilisierende Wirkung von Farnesol und Farnesal erkannt. Später isolierten Meyer et al.¹⁶ und Judy et al.¹⁷ das JH-II [Methyl-(2E,2E)-(10R,11S)-10,11-epoxy-3,7,11-trimethyl-2,6-tridecadienoat, Verbindung [2] in Schema 1], bzw. JH-III [Methyl-(2E,6E)-(10R)-10,11-epoxy-3,7,11-trimethyl-2,6-dodecadienoat, Methyl-10,11-epoxyfarnesoat, [3] in Schema 1] als weitere natürlich vorkommende Hormone.

Ein JH-0 [Methyl-(2E,6E,10Z)-10,11-epoxy-3,7-diethyl-11-methyl-2,6-tridecadienoat] wurde bisher nicht gefunden. Das synthetische Produkt¹⁸ liegt mit seiner juvenilisierenden Wirkung zwischen der von JH-II und -III (im Galleria-Test) bzw. über der von JH-I (im Tenebrio-Test)¹⁹.

Auf die Existenz eines Juvenilhormons (JH, Corpus-allatum-Hormon) wurde zuerst von Wigglesworth²⁰ hingewiesen, als er zeigte, daß sich junge Insektenlarven nach dem Entfernen der Corpora allata vorzeitig verpuppen. Die wesentliche Wirkung der Juvenilhormone (Übersicht bei Novak²¹ und Slama²²) besteht bei den larvalen Stadien der Insekten darin, den larvalen Zustand über eine Häutung

hinweg aufrechtzuerhalten. Bei Abwesenheit von JH führt die nächste Häutung einen Schritt weiter in der Morphogenese. Implantation von Corpora allata in das letzte Larvenstadium eines Insekts oder dessen Behandlung mit JH kann dagegen statt zur Verpuppung zu einer zusätzlichen Larven-Larvenhäutung führen^{23,24}. Im Prinzip gleiche Wirkung haben aktive Corpora allata auf Puppen: Man erhält nach der Häutung ein zweites Puppenstadium oder Puppen-Adult-Zwischenformen²⁵. Äußere Anwendung von Juvenilhormon oder Injektion unter die Cuticula bei Puppen verhindert die Bildung einer Erwachsenenecuticula im Wirkungsbereich^{7,8,15,22,26,27,28}, oder führt zu unvollkommenen Imagines²², meist mit pupalem Hinterleib (Abdomen). Bei erwachsenen Insekten stimuliert JH die Entwicklung der Ovarien^{22,29,73}.

Auf diesen verschiedenartigen Wirkungen bauen mehrere biologische Tests für den Nachweis von Juvenilhormon auf (Übersicht s. Slama²²). Sie alle erlauben nur eine Aussage über Juvenilhormon-Aktivitäten, solange die zu prüfenden Extrakte nicht extrem vorgereinigt und die drei Juvenilhormone nicht voneinander getrennt sind. Jeder Test reagiert auf die drei JH mit unterschiedlicher Empfindlichkeit. So sind im Tenebrio-Test gleiche Effekte wie mit JH-I und JH-II erst mit der 10^4 fachen Menge JH-III zu erhalten, im Galleria-Wachs-Test (dem empfindlichsten Test) mit der 10^2 fachen Dosis pro Testtier^{22,30}. Allerdings sind auch hier die Unterschiede in der Aktivität beträchtlich: Nach Lanzrein et al.¹¹ wirkt JH-III um den Faktor 40 - 100 schlechter als JH-I, Müller et al.³¹, Bergot et al.³² und Trautmann et al.³³ geben einen Faktor von 45 an,

Röseler und Röseler³⁴ finden nur einen Faktor von 5. Der Vergleich von Daten, die mit dem gleichen Test gewonnen wurden, wird auch noch dadurch erschwert, daß die Empfindlichkeit eines Tests für ein bestimmtes JH von Labor zu Labor (Faktor > 10) schwankt, von der Vorreinigung der Extrakte abhängt (Faktor > 8)³⁵ und zusätzlich individuelle Unterschiede hinzukommen^{36,37}. Trotz dieser Einschränkung wurden Proben von Bienenextrakten zur Untersuchung mit dem Galleria-Wachs-Test an das Institut für Zoophysiologie in Bern (Prof. M. Lüscher) gegeben. Die erhaltenen Daten sollten mit den - zum Teil aus dem gleichen Extrakt - analytisch bestimmten, verglichen werden. Neben diesen Methoden wurden in jüngster Zeit Radioimmuntests für die Messung von JH-Konzentrationen entwickelt^{38,39,40}, über deren Brauchbarkeit für biologische Probleme jedoch noch Zweifel angebracht sind.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die chemisch-analytische Bestimmung der Juvenilhormone im für biologische Tests üblichen Mengenbereich. Nur dieser Weg erlaubt bis jetzt eine befriedigende Quantifizierung, da er immer auch mit der Identifizierung des jeweiligen Juvenilhormons verbunden ist. Bei Insekten mit hohen JH-Titern ($> 0,1 \mu\text{g/g}$) reichen für den Hormonnachweis relativ unempfindliche analytische Methoden aus, wie z.B. HPLC oder Gaschromatographie mit Nachweis im Flammenionisationsdetektor (FID). Mit GC-MS und Messung ausgewählter Fragmente des underivatisierten JH konnten Bieber et al.⁴¹ JH-I quantifizieren. Für die Messung von nativem Juvenilhormon in niedrigeren Konzentrationen (ng-Bereich) hatten Trautmann et al.⁴² mit Gaschromatographie über Kapillar-

säulen und Lanzrein et al.¹¹ mit Gaschromatographie-Chemische-Ionisations-Massenspektrometrie Empfindlichkeiten im ng-Bereich (pro Einzelmessung) erreicht. Mehr als tausendmal empfindlicher lassen sich Juvenilhormone nachweisen, wenn sie optimal für entsprechende selektive Detektoren derivatisiert werden. Diesen Weg waren Broekhoven et al.⁴³, Bergot et al.³², und Peter et al.⁴⁴ gegangen, die alle die Juvenilhormone für den gaschromatographischen Nachweis mit einem Elektroneneinfangdetektor (ECD) derivatisiert hatten. Für die Bestimmung der Juvenilhormon-Titer in Entwicklungsstadien beider weiblicher Kasten der Honigbiene wurden diese Methoden, soweit möglich, übernommen oder durch andere ersetzt. Insbesondere gelang es mit den Nonafluorhexanoethern der Juvenilhormone (JH-NFH) Derivate herzustellen, die hochempfindlich und äußerst selektiv mit Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie nachgewiesen werden können. Da Trautmann et al.³³ nur bei erwachsenen Bienenarbeiterinnen Juvenilhormon-Titer gemessen hatten, liegen jetzt für einen Vertreter aus der Klasse der Hymenopteren erstmals Juvenilhormon-Titer-Bestimmungen für alle Entwicklungsstadien vor. Ferner ist ein Vergleich der Hormontiter zwischen den beiden weiblichen Bienenkasten möglich geworden, der eine Diskussion möglicher regulatorischer Vorgänge am Ende der Larvenentwicklung erlaubt.

2. EXPERIMENTELLER TEIL

2.1 Apparate

Die Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) wurde mit einem Gerät Siemens S 200 durchgeführt. Der Probennachweis erfolgte mit einem Siemens/Zeiss PM 4 UV-Detektor in einer 10 µl-Durchflußküvette. In der Ionenaustauschchromatographie wurde auch ein LCM2-Drahtdetektor (Pye-Unicam) eingesetzt, in dem schwerflüchtige Substanzen mit einem FID nachgewiesen werden. Mit dem Siemens-Dosiersystem war es nicht möglich, Material quantitativ auf die Säule aufzutragen. Es wurde deshalb durch ein Doppelseptuminjektionssystem (Eigenbau, gemäß Pearce und Thomas⁴⁵) ausgetauscht, mit dem Hamilton-Hochdruckspritzen der Serie 8000 benutzt wurden, oder gegen ein septumloses Probeneinlaßsystem in Kombination mit Hochdruckspritzen 212B (Precision Sampling, Baton Rouge, USA).

Die Juvenilhormone und ihre Derivate wurden an einem Hewlett Packard Laborgaschromatographen Mod. 7620 über gepackte Säulen 2 m x 2 mm i.D. chromatographiert. Art und Menge der Juvenilhormone in der Honigbiene wurden mit einem Gaschromatographen des gleichen Herstellers (Mod. 5730), ausgerüstet mit einem ⁶³Ni-Elektroneneinfangdetektor (ECD), bestimmt. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit einem Integrator (Minigrator oder System I) von Spectra Physics, Darmstadt.

Die Massenspektren wurden mit einem Varian CH 7A Massenspektrometer, verbunden mit dem Rechnersystem SS 100, aufgenommen. Die Ionenquelle hatte bei der Aufnahme aller Spektren eine Temperatur von 220 °C, die Emission betrug 1 mA, die Elektronenenergie 70 eV. Für die Aufnahme der Massenspektren von Substanzen, die zuvor gaschromatographisch getrennt werden mußten, war ein Varian Gaschromatograph, Mod. 1440 über einen Watson-Biemann-Separator (250 °C) an das Massenspektrometer gekoppelt. Für die Trennung wurden gepackte Säulen benutzt. Bei Messungen nach dem SIM-Verfahren wurde zur Verbindung mit dem Massenspektrometer eine Pt-Ir-Kapillare mit offener Kopplung (Helium-Spülung, 25 ml/min) verwendet. Die Trennung erfolgte über eine Glaskapillarsäule (LKB).

H-NMR-Spektren wurden mit einem Gerät WH 90 (Bruker, Karlsruhe) in Deuteriochloroform und mit TMS als internem Standard aufgenommen.

Die Radioaktivität der markierten Verbindungen wurde in einem Flüssigkeitsszintillationszähler Tricarb, Mod. 3380-544 (Packard) bestimmt. Die Position radioaktiver Verbindungen auf Dünnschichtplatten wurde mit Hilfe eines Dünnschichtscanners LB 2721-2503 (Berthold) bestimmt. Als Zählgas diente Methan.

2.2 Reagenzien und Lösungsmittel

Sofern nicht ausdrücklich erwähnt, hatten die Lösungsmittel und Reagenzien (Merck, Darmstadt) p.A. Qualität. Für die HPLC verwendetes n-Hexan war gelegentlich nach Destillation (120 cm Füllkörperkolonne) über Natrium-Blei-Legierung wiederverwendet worden. Wegen großer Schwankungen in der Reinheit der p.a. Lösungsmittel unterschiedlicher Abfüllungen wurden vom n-Hexan alle verfügbaren Qualitäten der Fa. Merck auf ihre Verwendbarkeit getestet, außerdem die Qualitäten für rückstandsanalytische Untersuchungen der Firmen Baker, Carlo Erba, Mallinckrodt und Riedel de Haen.

Wasser war immer entionisiert und dann destilliert worden. Ethanol hatte DAB-Qualität (96 %, Merck). Ether war vom Hersteller mit ca. 7 ppm 2,6-Di-tertiärbutyl-4-methyl-phenol als Antioxidans stabilisiert. Für säurekatalysierte Reaktionen diente 70%ige Perchlorsäure, verdünnt mit den geeigneten Lösungsmitteln. Tetrahydrofuran wurde über KOH aufbewahrt und unmittelbar vor der Verwendung über eine Säule mit Aluminiumoxid, neutral, Aktivitätsstufe I, filtriert. 2,4-Dichlorbenzoylchlorid hatte Fluka (Buchs, Schweiz) geliefert und es wurde vor Verwendung im Vakuum bei 0,14 bzw. 2,5 Torr und 85 bzw. 175 °C Badtemperatur über eine 20 cm Vigreux-Kolonne destilliert. Heptafluorbuttersäureimidazol (HFBI), Heptafluorbuttersäureanhydrid (HFBA) und Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) stammten von Pierce (Rockford, USA) und wurden ohne weitere Reinigung verwendet. Silylierungsreagenzien waren von Pierce und Fluka. (1H,1H,2H,2H)-Perfluorhexanol (Nonfluorhexanol, NFH-OH) wurde von Riedel de Haen (Seelze) bezogen. Es wurde

in Mengen von 3 - 5 ml in einer Mikrodestillationsapparatur bei 88 °C Badtemperatur und 5 Torr über frisch geglühtem Molekularsieb destilliert. (1H,1H,2H,2H,3H,3H,4H,4H)-Perfluorooctanol (Nonafluorooctanol, NFO-OH) war ein Geschenk der Fa. Hoechst (Gendorf), das Juvenilhormon I der Fa. Procida S.A., Puteaux (Frankreich) und das Juvenilhormon II der Zoecon Corporation, Palo Alto (USA). Juvenilhormon III war in unserem Labor nach der Methode von Anderson et al.⁴⁶ aus Geranylaceton synthetisiert worden. [³H-C-10]-markiertes JH-I (spezifische Aktivität 13,5 Ci/mMol) wurde von NEN, Dreieichenhain, bezogen.

2.3 Chromatographische Methoden

2.3.1 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie (DC) diente der präparativen Reinigung synthetischer JH-Derivate, der Reinigung biologischen Materials und zur Abtrennung der Derivatisierungsreagenzien. Verwendet wurden Fertigplatten verschiedener Schichtdicke (Kieselgel 60 F 254, Merck) in den folgenden Fließmitteln:

- | | |
|---|---------------------------------------|
| A | n-Hexan/Ethylacetat (65:35) |
| B | Tetrachlormethan/Trichlormethan (1:1) |
| C | Dichlormethan |

Es wurde mit aufsteigender Entwicklung bei Kammersättigung getrennt. UV-absorbierendes organisches Material ($> 10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ JH und JH-Derivate auf 0,25 mm Dünnschichtplatten) wird beim Bestrah-

len mit Licht der Wellenlänge 254 nm durch Fehlen der Fluoreszenz als dunkle Flecken erkennbar.

Rückgewinnung der Substanzen von den Dünnschichtplatten

Aus dem Bereich, der die gewünschten Verbindungen enthielt, wurde das Kieselgel mit einem Skalpell ausgekratzt und in eine Glasfritte (G3 oder G4) geeigneter Größe gefüllt. War eine quantitative Gewinnung der Substanzen nötig (Ausbeutebestimmungen, biologische Proben) oder waren keine Substanzzonen erkennbar (Produkte von Reaktionen im Mikromaßstab), wurde ein breiterer Streifen Kieselgel isoliert, als der Laufstrecke der gesuchten Produkte entsprach. Das Kieselgel wurde dann mit Lösungsmittel überschichtet, das nach kurzer Zeit mit Luftdruck durch die Fritte gepreßt wurde. Das wiederholte man noch vier- bis sechsmal. Gleichzeitig beginnend mit der ersten Extraktion wurde das Filtrat im Stickstoffstrom vom Lösungsmittel befreit.

2.3.2 Hochdruckflüssigchromatographie

Mit Hilfe der Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) wurden die Produkte von Umsetzungen der Juvenilhormone präparativ gereinigt oder nachgereinigt. Für ihre Identifizierung wurden sie, eventuell nach Reinigung auf Dünnschichtplatten, auf eine geeignete HPLC-Säule aufgetragen und chromatographiert. Das Eluat aller größeren Peaks wurde aufgefangen, konzentriert und im Massenspektrometer vermessen. Für NMR-Messungen wurden auf die gleiche Weise, aber durch vielfach wiederholte Chromatographien, mg-Mengen der reinen Hauptkomponenten gesammelt. Darüberhinaus diente die HPLC zur Identifizierung der Produkte verschiedener Reaktionsansätze (Ver-

gleich der Retentionsvolumina), zur Feststellung der Reinheit von Produkten oder des Zerfalls solcher Produkte, zur Aufnahme von Reaktionskinetiken und zur quantitativen Abschätzung von Reaktionsausbeuten. Insbesondere war sie unentbehrlich für die Reinigung der biologischen Proben nach Derivatisierungsschritten. Außerdem wurde sie für die Trennung hydrophiler organischer Säuren an Ionenaustauschern eingesetzt. Zur Art der durch und durch porösen Ionenaustauscher gehört das Aminex A15 (Bio Rad, Richmond, USA); ein oberflächenbeschichtetes Kieselgel ist das AS Pellionex SAX (Reeve und Angle/Whatman, Ferrieres, Frankreich). Die Adsorptionschromatographie erfolgte mit Kieselgelmateriale von Merck (Darmstadt) und Whatman (Ferrieres).

Folgende Säulen, jeweils nur mit den angegebenen Lösungsmitteln (Eluentien), wurden benutzt:

- I 30 cm-Siemens-Säule, effektive Länge 29 cm, 3,2 mm i.D.,
V = 2,3 cm³, gefüllt mit Lichrosorb Si 60, 5 µm (Merck), mit
 - a 6 % Ether in n-Hexan
 - b 8 % Ether in n-Hexan
 - c 12 % Ether in n-Hexan
- II 25 cm Fertigsäule (Merck), 3 mm i.D., V = 1,7 cm³, gefüllt mit Lichrosorb Si 60, 7 µm (Merck), mit
 - 8 % Ether in n-Hexan
- III 25 cm Fertigsäule (Whatman), 4,3 mm i.D., V = 3,6 cm³, gefüllt mit Partisil 5 µm (Whatman), mit
 - a 1 % Methanol in n-Hexan
 - b 2 % Methanol in n-Hexan

- IV 165 cm Säule, Eigenbau, 2 mm i.D., $V = 5,2 \text{ cm}^3$, gefüllt mit AS Pellionex SAX (Whatman)
- V 50 cm-Siemens-Säule, effektive Länge 49 cm, 3 mm i.D., $V = 3,5 \text{ cm}^3$, gefüllt mit AS Pellionex SAX (Whatman)
- VI 30 cm-Siemens-Säule, effektive Länge 29 cm, 3 mm i.D., $V = 2,0 \text{ cm}^3$, gefüllt mit Aminex A15 (Bio Rad)
- VII 50 cm-Siemens-Säule, effektive Länge 49 cm, 3 mm i.D., $V = 3,5 \text{ cm}^3$, gefüllt mit Aminex A15 (Bio Rad)

Säule I war analog dem von Asshauer und Halasz⁴⁷ beschriebenen Verfahren von 3 mm auf 3,2 mm aufgebohrt worden und wurde mit Kieselgel, Lichrosorb Si 60, 5 μm (Merck) gefüllt. Zur Abtrennung feinsten Teilchen, die die Fließgeschwindigkeit negativ beeinflussen, wurde das Kieselgel mehrmals vorsichtig in Wasser suspendiert. Nach kurzer Sedimentationszeit wurde der Überstand jeweils dekantiert. Nach dem Trocknen im Exsiccator über CaCl_2 wurde es im Gemisch aus Tetrabromethan/Dioxan/Tetrachlormethan 4:3:3 mit Ultraschall suspendiert. Die weitere Behandlung und das Füllen der Säule geschah nach Asshauer und Halasz⁴⁷, wobei lediglich, da die Ultraschallbehandlung die Kieselgelklumpen nicht zu zerstören vermochte, die Suspension durch eine Fritte filtriert wurde, nachdem man die Klumpen vorsichtig zerdrückt hatte. Der Wert für den Asymetriefaktor As^2 liegt mit 9 für Nitrobenzol noch relativ hoch. Vor dem Aufbohren betrug er allerdings 36. Die Trennleistung der Säule ist zufriedenstellend, sie hat sich im vierjährigen Einsatz nicht verändert. Lediglich das Kieselgel am Säulenanfang wurde gelegentlich 3 - 5 mm tief ausgetauscht. In Säule IV und V wurde das mit dem Ionenaustauscher beschichtete

Kieselgel nach der Methode von Kirkland ⁴⁸ trocken (Tap-Fill-Method) eingefüllt. Säule VI und VII war nach der Methode von W. Strubert ⁴⁹ gefüllt worden. Dabei wurde zur Herstellung der Schwebesuspension wässrige CaCl_2 -Lösung verwendet.

2.3.3 Gaschromatographie

Die Gaschromatographie wurde benutzt, um den Verlauf von Umsetzungen zu verfolgen, um Reaktionskinetiken aufzunehmen und Ausbeuten abzuschätzen. Daneben diente sie bei einfachen Reaktionen zusammen mit anderen Methoden zur Identifizierung von Verbindungen (Vergleich der Durchbruchstemperatur oder der Retentionszeit). In diesen Fällen wurde mit Helium als Trägergas gearbeitet und die Substanz mit dem FID nachgewiesen. Insbesondere wurden mit ihr die Juvenilhormonderivate mit dem Elektroneneinfangdetektor bestimmt. Als Trägergas konnte dabei Argon/Methan (5 % oder 10 %) oder, mit niedrigerer Nachweisgrenze, Stickstoff verwendet werden. In allen Fällen wurden selbstgepackte Glassäulen, 2 m lang, 2 mm Innendurchmesser, verwendet. Als stationäre Phasen dienten OV 1, OV 17, SE 30 und OV 225, jeweils 3 % auf Gaschrom Q (Serva, Heidelberg). Übliche Aufnahmebedingungen: 195 oder 200 °C Ofentemperatur (isotherm), 200 °C Injektor und 300 °C Detektor. Der Gasfluß lag zwischen 23 und 30 ml/min. Für die Aufnahme von Eichkurven wurde das JH-III-HFB-Derivat in verschiedenen Konzentrationen (0,1; 0,5; 1 und 10 pMol/µl) und in verschiedenen Mengen (0,1 bis 8 µl) injiziert und die Signalintensität mit einem Integrator (Spectra Physics) gemessen. In biologischem Material wurden die

JH-Derivate entsprechend ihren Retentionszeiten identifiziert, die mit denen der drei synthetischen übereinstimmen mußten. Dazu wurden vor und zwischen den Messungen der zu untersuchenden Proben die synthetischen JH-Derivate wiederholt injiziert.

Bei Injektion von 0,1 µl einer 0,1 µmolaren Lösung (5 pg) JH-HFB war das Signal-Rauschverhältnis noch 16:1.

Der unterschiedliche Verschmutzungsgrad von n-Hexan machte es erforderlich, bei jeder neuen Lieferung die Reinheit zu überprüfen. Dazu wurde 6 ml n-Hexan mit Stickstoff abgeblasen und das Gefäß danach mit 50 µl des gleichen Lösungsmittels gespült. Von 4 µl dieses Hexans wurde bei gleicher Empfindlichkeit wie für die Bestimmungen von JH ein Chromatogramm aufgenommen. Nur wenn keine oder nur geringe Substanzmengen in unmittelbarer Nachbarschaft zu den JH-Retentionszeiten vom ECD nachgewiesen wurden, konnte das Lösungsmittel für die Chromatographie der biologischen Proben verwendet werden.

2.3.4 Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie

Bei den Untersuchungen mit dem GC-MS-System und "selected ion monitoring" (SIM, Terminologie gemäß Budde und Eichelberger⁵⁰) wurde eine 25 m Glaskapillarsäule (LKB, Typ 2101-402, 0,35 mm i.D., beschichtet mit SE 30) verwendet. Die Chromatographie wurde isotherm bei 250 °C und einem Gasfluß von 20 cm/s Helium durchgeführt. Injektortemperatur 275 °C, Geradeauseinlaß 250 °C, Ionenquellentemperatur ca. 220 °C, Emission 2 mA, 75 eV, Druck geringer als $3 \cdot 10^{-6}$ Torr (≤ 400 µPa). Am Magnet eingestellt war m/e 297 (Säulenbluten); m/e 305 und m/e 319 waren die Sprungmassen der

Computer-MIS (Computergesteuerte Variation der Beschleunigungs-
spannung, MIS für "multiple ion selection").

2.3.5 Eichlösungen

Für die Herstellung von Eichlösungen, die als externer Standard
dienten, wurden mindestens 4 mg des jeweiligen Derivates nach
Reinigung durch DC und HPLC in einen 1 ml, 2 ml oder 5 ml Meßkol-
ben eingewogen (elektronische Mikrowaage, max. Fehler 0,05 mg).
Das Material wurde in n-Hexan gelöst. Aus dieser Stammlösung wur-
den in mehreren Stufen Verdünnungen (max. 1:100) hergestellt. Im
benötigten Konzentrationsbereich wurden 3 bis 4 Lösungen verwen-
det, die sich um den Faktor 5 oder 10 unterschieden.

2.4 Synthese von JH-Derivaten (Makromaßstab)

10,11-Dihydroxy-JH (JH-Diol) wurde in Anlehnung an Judy et al.⁵¹
durch Umsetzen von JH in wässrigem HClO_4 (0,02 M) und Tetrahydro-
furan (3:5) synthetisiert. NMR* (CDCl_3 , TMS) JH-III-Diol [5]⁺:
 δ 5,68 ppm (H-2, s), 5,16 (H-6, m), 3,29 (H-10, q), 2,9 ($\text{C}_{10}\text{-OH}$,
s) und ($\text{C}_{11}\text{-OH}$), 1,12 und 1,16 (H-12 und H-13, je s), 1,60 (H-14,
s), 2,15 (H-15, m), 3,68 (H-16, s).

10,11-Bisheptafluorbutyryloxy-JH (JH-bis-HFB) wurde gemäß Broek-
hoven et al.⁴³ aus JH-Diol und Heptafluorbuttersäureanhydrid

* Zur Numerierung der Protonen vgl. Schema 4, S. 71 (JH-III) bzw.
Schema 3, S. 68 (JH-I).

⁺ Die Formelbilder der Verbindungen sind in der Klapptafel nach
S. 118 zu finden.

(HFBA) in Pyridin/Benzol (1:1) hergestellt. Ferner durch direkte Umsetzung der Reaktionspartner bei folgenden optimalen Reaktionsbedingungen: Zu 200 µg JH-III in 300 µl n-Hexan p.A. (oder mit Wasser gesättigt) gab man 30 µl Benzol, 15 µl Pyridin und 50 µl HFBA. Nach 30 Min. wurden die Lösungsmittel im Rotationsverdampfer abgezogen. Der feste, u.U. ölige Rückstand wurde mit n-Hexan extrahiert und der Extrakt mit HPLC gereinigt. NMR (CDCl₃, TMS) JH-I-bis-HFB [33]: δ 5,65 ppm (H-2, m), 5,04 (H-6, m), 0,93 (H-13 und H-16, t), 1,57 (H-14, s), 2,16 (H-17, m), 3,68 (H-18, s).

10-Hydroxy-11-methoxy-JH (JH-OMe, JH-Methoxyhydrin) wurde ähnlich wie bei Peter et al.⁴⁴ und Bergot et al.³² angegeben, dargestellt. Die dabei verwendete Methanol/HClO₄-Lösung - 10 µl 70%ige HClO₄ in 50 ml absolutem Methanol - ist nicht länger als 4 Wochen verwendbar. Für die Reaktion wurden in einem 6 ml Reaktionsröhrchen 1 - 5 mg JH in 0,3 ml perchlorsäurehaltigem Methanol (0,014 %) gelöst. Nach 30 Minuten (bei Raumtemperatur) wurde mit 3 ml 2%iger Kochsalzlösung verdünnt und 1mal mit 0,3 ml und 5mal mit 0,1 ml Ethylacetat extrahiert. Nach dem Konzentrieren der Lösung wurde das Produkt dünnschichtchromatographisch im System A gereinigt (Rf-Werte siehe Tabelle 11, S. 69). Die Ausbeute lag zwischen 83 % und 91 %. Durch anschließende HPLC über Säule IIIb konnten die Methoxyhydrine weiter gereinigt werden. Die Ausbeute lag danach bei 76 - 85 %. NMR (CDCl₃, TMS) JH-I-OMe [15]: δ 5,68 ppm (H-2, s), 5,08 (H-6, m), 2,37 (C₁₀-OH, s), 0,84 (H-13, t), 1,03 (H-14, s), 0,96 (H-15, t), 2,16 (H-17, s), 3,68 (H-18, s), 3,19 (H-19, s). Die Derivatisierung im Mikromaßstab (1 ng bis 1 mg) erfolgte in der gleichen Weise wie für die biologischen Proben (s.u.).

Analog wurde 10-Hydroxy-11-ethoxy-JH und 10-Hydroxy-11-octoxy-JH synthetisiert. Bei den JH-Octanoladdukten schloß sich nach dem Konzentrieren der Lösung eine dünnschichtchromatographische Reinigung im System A oder C an, um das Octanol vom Produkt zu trennen. Die Ausbeuten lagen für alle drei JH-Alkoxyaddukte über 80 %.

NMR (CDCl_3 , TMS) 11-Ethoxy-10-hydroxy-JH-III [8]: δ 5,66 ppm (H-2, m), 5,14 (H-6, m), 2,58 (H-10, m), 1,09 (H-12, s), 1,11 (H-13, s), 1,62 (H-14, s), 2,16 (H-15, m), 3,68 (H-16, s), 3,43 (H-17, q), 1,16 (H-18, t).

10-(2,4-Dichlorbenzoyloxy)-11-methoxy-JH (JH-DCB) wurde entsprechend dem Verfahren von Peter et al.⁴⁴ hergestellt. Die DC-Reinigung erfolgte im System A, die HPLC-Reinigung über Säule I, Eluens a und b (s.S. 15). NMR (CDCl_3 , TMS) JH-III-DCB [29]:

δ 5,66 ppm (H-2, m), 5,1 und 5,2 (H-6, H-10, m), 1,21 und 1,26 (H-12, H-13, je s), 1,59 (H-14, m), 2,15 (H-15, m), 3,68 (H-16, s), 3,24 (H-17, s), 7,78 (H-18, d), 7,42 (H-19 und H-20, q).

10-Heptafluorbutyryloxy-11-methoxy-JH (JH-HFB): 1 bis 4 mg JH-Methoxyhydrin wurden in einem 3 ml-Reaktionsgefäß auf 40 °C erwärmt. Durch Einblasen von trockenem Stickstoff wurde eventuell vorhandene Feuchtigkeit entfernt. Nach dem Einfüllen von 100 μl Heptafluorbutyrylimidazol wurde das Reaktionsröhrchen mit einer teflonbeschichteten Gummidichtung luftdicht verschlossen und im Aluminiumblock für mindestens 30 Minuten auf 60 °C erhitzt. Ein großer Teil des Reagenzes konnte dann im Stickstoffstrom entfernt werden. Aus dem Rückstand wurde der Heptafluorbuttersäureester mit Ether extrahiert. Die etherische Lösung wurde unmittelbar auf eine 0,5 mm dicke Dünnschichtplatte aufgetragen. Nach dem Entwik-

keln im Laufmittel A konnte das Produkt mit Ether aus dem Kieselgel extrahiert werden. NMR (TMS) JH-I-HFB [24]: δ 5,67 ppm (H-1, s), 5,15 (H-6, m), 5,0 (H-10, m), 0,94 (H-13, t), 1,12 (H-14, s), 0,88 (H-15, t), 2,17 (H-17, s), 3,68 (H-18, s), 3,16 (H-19, s).

Herstellung von 0,5 ml 0,06%iger HClO_4 in NFH-OH. 10 μl HClO_4 wurden in 10 ml Ethylacetat gelöst. Von 0,43 ml dieser Lösung wurde im Stickstoffstrom das Lösungsmittel abgeblasen, dann mit 0,5 ml NFH-OH aufgefüllt. Ein dabei meist auftretender feinkörniger Niederschlag bleibt unbeachtet.

Darstellung von JH-NFH-Derivat. 6,8 mg (25,6 μMol) JH-III wurden in 100 μl NFH-OH gelöst und dann mit weiteren 100 μl NFH-OH, 0,06%ig an Perchlorsäure, vermischt. Nach 50 Minuten bei Raumtemperatur wurde mit 100 μl Ethylacetat verdünnt und im Stickstoffstrom auf ca. die Hälfte eingeeengt. Dies wurde noch 3mal wiederholt. Dann folgte eine DC-Reinigung im Laufmittel C. Nach HPLC-Reinigung am System Ic erhielt man 5,1 mg (9,6 μMol , 37,6 %) reines Produkt. NMR (CDCl_3 , TMS) JH-III-NFH [10]: δ 5,66 ppm (H-2, m), 5,14 (H-6, m), 1,46 (H-9, m), 1,86 (C_{10} -OH, m), 1,15 und 1,13 (H-12 und H-13, je s), 1,61 (H-14, s), 2,16 (H-15, m), 3,68 (H-16, s), 3,68 (H-17, t).

Entsprechend wurden 3,25 mg (11 μMol) JH-I in insgesamt 100 μl NFH-OH zu 2,1 mg JH-I-NFH-1 und 0,4 mg JH-I-NFH-2 (vgl. S. 72 ff) umgesetzt. Die Gesamtausbeute an 10-Hydroxy-11-nonafluorhexoxy-JH-I betrug 41 %. NMR (CDCl_3 , TMS) JH-I-NFH-1 [18]: δ 5,67 ppm (H-2, m), 5,10 (H-6, m), 3,54 (H-10, m), 0,84 (H-13, t), 1,09 (H-14, s), 0,97 (H-15, t), 2,16 (H-17, d), 3,68 (H-18, s), 3,65

(H-19, m). JH-I-NFH-2: δ 0,79 ppm (H-13, m), 1,14 (H-14, s), 0,97 (H-15, t). Für die Reaktion von Nonafluorooctanol (NFO-OH) mit JH waren die gleichen Reaktionsbedingungen optimal wie für die Reaktion mit NFH-OH, die Ausbeute an 10-Hydroxy-11-alkoxy-addukt war mit 45 - 48 % für JH-III und 47 % für JH-I günstiger. Die Umesterung von Methyl-10,11-epoxyfarnesoat (JH-III) zum Ethyl-10,11-epoxyfarnesoat (JH-III-Et) lehnte sich im wesentlichen an die Methode von Mori et al.⁵² an. 10 mg (37,6 μ Mol) JH-III wurden in einem 3 ml Reaktionsgefäß, das mit einer teflonbeschichteten Gummidichtung luftdicht verschlossen war, in 1,5 ml 96%igem Ethanol (DAB) über festem KCN erhitzt. Dazu war das untere Drittel in einen auf 85 °C erwärmten Aluminiumblock gestellt worden. Nach 4 Tagen war alles JH-III umgeestert. Nach dem Erkalten wurde die ethanolische Lösung vom KCN abgehoben, das KCN einmal mit 200 μ l Ethanol gewaschen, und das Ethanol im Stickstoffstrom abgeblasen. Der Rückstand wurde in 1,5 ml n-Hexan aufgenommen. Zur Entfernung restlichen KCN's wurde mit 0,5 ml Wasser gewaschen. Danach konnte die n-Hexanlösung in mehreren Portionen über eine Hochdrucksäule (Säule Ic) chromatographisch gereinigt werden. Durch Entnahme von je 10 μ l Reaktionslösung nach 16, 40, 64, 88 und 96 Stunden, Behandlung wie oben beschrieben und Aufnahme eines HPLC-Chromatogramms, wurde die Umsetzungs kinetik aufgenommen. Die Ausbeute betrug 8,2 mg (29,3 μ Mol), das entspricht 79 %, bzw. bei Berücksichtigung der Zwischenproben, 81 %. NMR (CDCl_3 , TMS) JH-III-Et [4]: δ 5,67 ppm (H-2, m), 5,15 (H-6, m), 2,70 (H-10, m), 1,26 (H-12, s), 1,30 (H-13, s), 1,70 (H-14, m), 2,16

(H-15, m), 4,14 (H-16, q), 1,27 (H-17, t).

Umsetzung von Ethyl-10,11-epoxyfarnesoat (JH-III-Et) mit NFH-OH und Bestimmung der Ausbeute relativ zum JH-III

Ein Gemisch von JH-III und JH-III-Et (ca. je 500 µg), deren Mengenverhältnis im HPLC-Chromatogramm (optische Dichte bei 218 nm) mit 1,222:1 bestimmt worden war, wurde in der beschriebenen Weise mit NFH-OH umgesetzt. Nach der dünnschichtchromatographischen Reinigung und Extraktion des Kieselgels mit Ether wurden Anteile des Extrakts in n-Hexan mit HPLC gereinigt (Säule Ic). Das Produktverhältnis war mit 1,220:1 bei gleichen Chromatographiebedingungen gleich dem der Ausgangsprodukte.

Bestimmung der Radioaktivität

Die Radioaktivität wurde mit einem Szintillationszähler bestimmt. Als Szintillator diente ein Gemisch aus 1 l Toluol, 5 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO) und 0,3 g 2,2-p-Phenylenbis(5-phenyl)-oxazol (POPOP). Die Zählausbeute betrug für Tritium $42 \pm 1 \%$.

2.5 Sammeln des Bienenmaterials

Als Ausgangsmaterial dienten verschiedene Entwicklungsstadien der Bienenrasse Carnica, die am Institut gehalten werden. Sofort nach Entfernen aus der Brutwabe wurden die Tiere in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann bei -22°C gelagert. Zum Sammeln größerer Mengen (Portionen zu 20 g) benötigt man eine verhältnismäßig homogene Brutwabe. Gesammelt wurden Larven vom dritten Larvenstadium (L3) an, verschiedene Puppenstadien und frisch ge-

schlüpfte Tiere. Die Zuordnung einzelner Tiere zu den verschiedenen Larvenstadien geschah nach Größe und Gewicht, während die Puppen nach äußeren Merkmalen (Pigmentierung der Augen und Cuticula) unterschieden wurden. Zum Sammeln frisch geschlüpfter Erwachsener (A1) stellte man eine Brutwabe in einen Inkubator und alle Tiere, die innerhalb von 15 Std. geschlüpft waren, konnten als A1 gelten. Larvenstadien definierten Alters wurden gewonnen, indem man eine Königin auf einer leeren Wabe abspernte, sie 6 Stunden lang Eier ablegen ließ und die Wabe dann für die weitere Eiablage unzugänglich machte. Da die Larven aus gleich alten Eiern mit einem zusätzlichen zeitlichen Abstand schlüpfen, liegt die alters- und entwicklungsmäßige Streuung bei $\pm$ 6 Stunden.

Die Königinnenlarven wurden von einem Züchter bezogen. Ein einigermaßen definiertes Alter erreichte man auch hier durch Absperren der Königin. Bei größeren Unterschieden zwischen gleichaltrigen Larven, oder bei witterungsbedingter Verzögerung des Aufwachsens, wurden sie den Entwicklungsstadien nach Gewicht und Größe (Kremer, Ulrich, pers. Mitteilung) zugeordnet. Sollte der Hormontiter einzelner Tiere bestimmt werden, wurden sie vor dem Einfrieren gewogen.

2.6 Aufarbeitung von Bienenmaterial für JH-Bestimmungen

2.6.1 Extraktion von Insektenmaterial und Vorreinigung der Extrakte

Die Juvenilhormon enthaltenden Extrakte wurden aus je 4 bis 30 Individuen nach zwei Verfahren gewonnen, von denen das zweite das schnellere ist. Für die Extraktion von einzelnen Tieren wurde es noch weiter vereinfacht. Wegen der geringen Hormonmengen bedurfte es besonderer Vorsichtsmaßnahmen, um Kontamination mit Hormon oder Hormonderivat synthetischen Ursprungs zu verhindern. Deshalb wurden alle Gefäße unmittelbar vor der Benutzung mit frischem Methanol und Ethylacetat gespült. NaCl und Na₂SO₄ wurden über Nacht auf 300 °C erhitzt.

1. 1 - 5 g Ausgangsmaterial wurde in einem 15 ml Braun-Homogenisator (Potter) in 5 ml Methanol/Ethylacetat (1:1) bei Eiskühlung mit einem Teflonstempel homogenisiert. Bei Material mit hohem Chitingehalt (späte Puppenstadien, adulte Tiere) wurde in zwei Portionen homogenisiert. Das Homogenat wurde zentrifugiert und der Überstand abgehoben. Nach viermaliger Wiederholung der Extraktion des Niederschlages wurde die Lösung auf ein Volumen von 10 - 15 ml eingeengt, ein Volumen, bei dem Stoßen und Verspritzen des Konzentrats gerade erst begonnen hatte. Zu diesem methanolhaltigen Rohextrakt wurden 15 - 20 ml 1,7%iger wässriger Kochsalzlösung gegeben. Daraus wurde einmal mit 20 ml, und fünfmal mit 10 ml n-Hexan extrahiert. Nach Trocknen der Hexanlösung mit frisch gegläu-

tem Na_2SO_4 , Filtration und Waschen des Natriumsulfats mit n-Hexan wurde das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer eingeengt. Der trockene Extrakt wog noch ca. 4 % des Gewichts der Ausgangsmenge (2,5 - 4,6 %).

Die n-Hexan-Lösung wurde in ein 10 ml-Zentrifugenröhrchen übertragen. Nach dem vollständigen Entfernen des Lösungsmittels im Stickstoffstrom wurde der Rückstand in 6 ml Ether/Methanol (1:1) gelöst. Das verschlossene Zentrifugenröhrchen wurde für 20 - 30 Sekunden in flüssigem Stickstoff, dann für mindestens 20 Minuten in Trockeneis gekühlt. Danach wurde es, eingepackt in Trockeneis, zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben, der Niederschlag noch dreimal mit 4 ml kaltem Lösungsmittel aufgeschüttelt, kurz mit flüssigem Stickstoff gekühlt und wie vorher beschrieben zentrifugiert. Die vereinigten Extrakte wurden im Stickstoffstrom völlig vom Lösungsmittelgemisch befreit, in Ethylacetat gelöst und auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen.

Die Tieftemperaturfällung führt zu einer 6- bis 10fachen Anreicherung des Hormons, bezogen auf den n-Hexanextrakt. Die Extraktmenge entspricht 0,5 - 0,6 % vom Gewicht des Ausgangsmaterials. 0,1 - 2 % der Juvenilhormone bleiben im Niederschlag (Messung der Radioaktivität). 70 - 95 % des Extrakts sind in Ethylacetat löslich und können auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen werden.

2. 0,8 - 5 g Tiermaterial wurde mit flüssigem Stickstoff von -22°C auf -196°C gekühlt und über Nacht lyophilisiert. Chitinreiche Stadien wurden vorher unter flüssigem Stickstoff mit einem Glasstab vorzerkleinert. Die trockenen Tiere wurden mit 3 oder

5 ml (je nach Ausgangsmenge) Methanol viermal homogenisiert. Das Methanol der Extrakte ließ sich im Rotationsverdampfer fast ohne Verspritzen abziehen. Der Rohextrakt wurde einmal mit 5 ml und dreimal mit 2 ml Ether extrahiert. Ein jeweils mit abgehobener feinkörniger Niederschlag konnte durch Zentrifugation abgetrennt werden. Der Ether wurde im Stickstoffstrom abgeblasen. Nach dem Lösen des Rückstandes in 4 ml Methanol/Ether (1:1) folgte die Tieftemperaturfällung und -zentrifugation. Das danach erhaltene Material (0,5 % des Anfangsgewichtes) konnte unmittelbar in Ethylacetat auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen werden.

Aufarbeitung einzelner Tiere. Eine tiefgefrorene Bienenlarve oder -puppe wurde in einem 5 ml Pottergefäß mit 1 ml Methanol homogenisiert. Nach dreimaliger Wiederholung und Beseitigung des Lösungsmittels im Rotationsverdampfer wurde der Rohextrakt einmal mit 2 ml und dreimal mit 1 ml Ether extrahiert. Nach Abblasen des Ethers wurde der Rückstand viermal mit 150 µl Aceton extrahiert. Das acetonlösliche Material ließ sich nach Abblasen des Lösungsmittels direkt in Ethylacetat auf eine Dünnschichtplatte auftragen.

2.6.2 Reinigung der lipidhaltigen Extrakte durch Dünnschichtchromatographie

In allen Fällen folgte auf diese Vorreinigung das Auftragen des öligen Extrakts in Ethylacetat auf Dünnschichtplatten. Da sich nicht alles Material löst, ist dies gleichzeitig ein weiterer extraktiver Reinigungsschritt. Stärke der Dünnschichtplatte und

Breite des Auftragens richtete sich nach der angefallenen Menge. Als Referenz diente bei 0,5 mm und 0,25 mm dicken Platten Dibutylphthalat. Die Platten wurden im Laufmittel A (s.S. 13) entwickelt. Die Zone, in der die Juvenilhormone zu erwarten waren (R_f 0,38 - 0,57) wurde ausgekratzt und das Kieselgel auf einer Glasfritte mit Ethylacetat extrahiert. Bei Proben, die mit dem Galleria-Test oder mit dem GC-MS-SIM-Verfahren untersucht werden sollten, schloß sich eine zweite dünnschichtchromatographische Reinigung im System B an. Ferner, wenn nach der ersten Dünnschichtchromatographie mehr als ca. 5 μ l Extrakt pro g Ausgangsmaterial angefallen waren. Mit Ethylacetat wurde das Kieselgel im Bereich zwischen R_f 0,22 und 0,43 extrahiert. Als externe Referenz diente wieder Dibutylphthalat. Sofern zur Ausbeutebestimmung zu Beginn der Extraktion tritiiertes JH-I hinzugegeben worden war, konnte dessen Position mit dem Dünnschichtscanner (Berthold) bestimmt werden.

2.6.3 Galleria-Wachs-Test

Die Bestimmung der JH-Aktivität mit dem Galleria-Wachs-Test in Extrakten aus Entwicklungsstadien der Biene wurde vom Institut für Zoophysiologie der Universität Bern (Prof. M. Lüscher) durchgeführt.

2.6.4 Derivatisierung und weitere Anreicherung von Juvenil- hormonen aus biologischen Proben

Das nach der DC-Reinigung verbliebene Material wurde auf zwei Wegen weiterverarbeitet, die von der vorgesehenen Nachweismethode abhängen. Alle Derivatisierungen wurden in konischen 2 ml-Reaktionsröhrchen durchgeführt. Soweit möglich, wurden diese über mehrere Anreicherungsschritte für dieselbe Probe ohne Reinigung zwischendurch weiterverwendet.

2.6.4.1 Derivatisierung für Messungen mit dem ECD

Zu einer Probe biologischen Ursprungs wurden 0,05 ml Methanol/ HClO_4 gegeben. Das Material wurde vollständig darin gelöst. Nach frühestens 30 Minuten wurden 0,5 ml 2%ige wässrige Kochsalzlösung und 0,05 ml Ethylacetat hinzugefügt. Das Ethylacetat wurde abgehoben und die Extraktion noch viermal mit der gleichen Menge wiederholt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Stickstoffstrom wurde der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und als dünne Linie auf eine Dünnschichtplatte (0,25 mm) aufgetragen. Um das Material quantitativ zu übertragen, wurden die Gefäßwände mehrmals mit kleinen Mengen Ethylacetat benetzt und dies ebenfalls aufgetragen. Nach Entwicklung im System A wurde die DC-Platte an der Luft getrocknet. Die Position der die JH-Derivate enthaltenden Zone wurde anhand des externen Standards Dibutylphthalat bestimmt, soweit möglich auch durch Messung der Radioaktivität mit dem Dünnschichtscanner. Das Kieselgel wurde mit Ethylacetat extrahiert, welches dann im Stickstoffstrom entfernt wurde. Der Rückstand wurde mit HPLC, Säule

IIIa, weitergereinigt. Zusammen mit der Feststellung der Retentionsvolumina der aus den Juvenilhormonen synthetisierten Methoxyhydrine (V_R : 9, 10 und 12 ml, vgl. Tab. 9) wurde auch das Retentionsvolumen von Triphenylmethanol mit 10,9 ml bestimmt. Danach wurde das System, insbesondere auch das Injektionssystem, sorgfältig, mit mehreren Unterbrechungen, mit insgesamt mehr als 500 ml Eluens gespült. Nach dieser einmaligen Kalibrierung wurde später nur noch Triphenylmethanol für die Eichung verwendet. Um das biologische Material quantitativ auf die Säule aufzutragen, wurde die Probe in 10 - 20 μ l n-Hexan gelöst und in eine 50 μ l Hochdruckspritze, in der sich schon 5 - 10 μ l Lösungsmittel befanden, aufgezogen. Das Gefäß wurde noch zweimal mit wenig Eluens gespült, die Lösung im Stickstoffstrom konzentriert und mit in die Spritze aufgenommen. Nach der Injektion beträgt der Materialverlust einschließlich des Rückstandes in der Spritze 1 - 5 %. Das die JH-Derivate enthaltende Eluat wurde durch Abblasen mit Stickstoff eingengt und bis zur weiteren Derivatisierung in einem Reaktionsgefäß unter Stickstoff bei 4 °C aufbewahrt.

Das trockene Material wurde im Reaktionsröhrchen auf 40 °C erwärmt, für ca. 10 Sekunden durch Überblasen mit Stickstoff nachgetrocknet und dann in 10 - 15 μ l Heptafluorbutyrylimidazol gelöst. Das sofort verschlossene Röhrchen wurde dann für 30 Minuten auf 60 °C erwärmt. Durch Einblasen von Stickstoff wurde überschüssiges Reagenz entfernt. Der Rückstand wurde sechsmal mit 25 μ l Ether extrahiert, welcher unmittelbar auf eine DC-Platte (0,25 mm) aufgetragen wurde. Schließlich wurde die restliche Substanz in 100 μ l Wasser aufgenommen, das noch zweimal mit je 25 μ l Ether

extrahiert wurde. Die Platte wurde in System A entwickelt. Dabei diente DBP wieder als externe Bezugssubstanz. Die JH-HFB-Derivate wurden aus der Zone mit R_f -0,48 bis R_f -0,67 mit Ether extrahiert. Das lösungsmittelfreie Material wurde bis zur HPLC-Reinigung unter Stickstoff aufbewahrt. Diese wurde mit Säule Ia, Ib oder II durchgeführt.

Ähnlich dem Verfahren bei der Chromatographie der JH-Methoxyhydrine wurden die Säulen jetzt mit JH-HFB-Derivaten und mit den Weichmachern Dibutylphthalat und bis(Ethylhexyl)phthalat geeicht. Deren Retentionsvolumina liegen zwischen bzw. vor denen der JH-HFB-Derivate. Da beide Weichmacher bei der Reinigung biologischer Proben mit angereichert werden, läßt sich an ihrem Retentionsvolumen die Konstanz des chromatographischen Systems leicht ablesen. Das alle drei JH-Derivate enthaltende Eluat wurde gesammelt, die Lösung im Stickstoffstrom eingeeengt und das Konzentrat in graduierte Gefäße mit einem Gesamtvolumen von 100 - 150 μ l quantitativ übertragen. Nach Beseitigung des restlichen Lösungsmittels wurde die Probe in 50 oder 100 μ l n-Hexan gelöst. In Anteilen davon wurde die Radioaktivität bestimmt und daraus die Ausbeute errechnet. Von der gleichen Lösung wurde mit dem GC-ECD-System der JH-Gehalt gemessen. Von jeder Probe wurden über jede Säule mindestens vier Chromatogramme aufgenommen.

Da es später nicht mehr gelang, ein n-Hexan ausreichender Reinheit zu erhalten, wurde das HPLC-Eluat fraktioniert gesammelt. Das die JH-HFB-Verbindungen enthaltende Eluat wurde in Fraktionen von 20 Sekunden (500 - 530 μ l) gesammelt und jede Fraktion einzeln auf ihren JH-Gehalt untersucht.

2.6.4.2 Derivatisierung für den JH-Nachweis mit dem Massenspektrometer

Das biologische Material wurde in 10 bis 25 µl NFH-OH gelöst. Um alles Material aufzunehmen, wurde das ganze untere Drittel des Gefäßes benetzt und gegebenenfalls auf 40 °C erwärmt. War das biologische Material nicht löslich, wurde es möglichst fein im NFH-OH suspendiert. Dann wurde eine gleiche Menge Nonafluorhexanol/HClO₄ (0,06 %) hinzugegeben und sofort gut mit der vorhandenen Lösung vermischt. Nach 30 min wurde mit 50 µl Ethylacetat verdünnt und im Stickstoffstrom auf etwa die Hälfte des Gesamtvolumens eingengt. Nach noch dreimaliger Wiederholung wurde die übrige Lösung als mindestens 2 cm lange Linie auf eine 0,25 mm dicke Dünnschichtplatte aufgetragen. Der Entwicklung im Laufmittel A oder C folgte die Extraktion der NFH-Derivate mit Ether oder Ethylacetat. Deren Position wurde entweder mit dem Dünnschichtscanner oder anhand des noch vorhandenen freien NFH-OH bestimmt. Nach Entwicklung im Laufmittel A wurde die Zone mit R_f 0,5 bis 0,8 ausgekratzt, bei Fließmittel C mit R_f 0,4 bis 0,7.

War im Extrakt noch NFH-OH oder verhältnismäßig viel biologisches Material (mehr als 1,5 mg) vorhanden, folgte eine zweite DC-Reinigung im System C oder A. Der Extrakt konnte unmittelbar mit dem Kapillar-Gaschromatographen/Massenspektrometer auf seinen JH-Gehalt untersucht werden. Dazu wurde die Probe im verschlossenen Reaktionsröhrchen in 10 bis 500 µl n-Hexan gelöst und 0,1 bis 0,2 µl dieser Lösung in den GC injiziert (Splitless). War nach der zweiten DC immer noch viel Probensubstanz übriggeblieben, wurde sie mit HPLC gereinigt (Säule Ic) und erst dann im Massenspektro-

meter vermessen. Sonst diente die HPLC nach der Messung nur noch zur genauen Ausbeutebestimmung.

2.7 Ausbeutebestimmungen

Bei Substanzmengen von mehr als 0,8 mg konnte die Ausbeute durch Wiegen der Ausgangs- und Endprodukte bestimmt werden. Die Bestimmungen im Mikromaßstab (0,8 ng - 0,1 mg) und in biologischen Proben erfolgten mit Hilfe von tritiiertem JH-I, daneben auch chemisch-analytisch. Für die Bestimmung von Reaktionsausbeuten wurden definierte Mengen der markierten Verbindung, allein oder zusammen mit unmarkierter Substanz, umgesetzt. Nach der chromatographischen Reinigung wurde aus der im Eluat oder Extrakt vorhandenen Radioaktivität die Ausbeute errechnet. Bei der Aufarbeitung von Bienenmaterial wurde tritiiertes Hormon ganz am Anfang, vor dem Homogenisieren, zugesetzt. Durch Messung von Anteilen der jeweiligen Extrakte lassen sich die Ausbeuten während der Anreicherung der Juvenilhormone feststellen, später auch die der Derivatisierungs- und Reinigungsschritte. Durch Messung der Radioaktivität in Anteilen der gleichen Lösung, die mit GC-ECD oder GC-MS untersucht wird, kann die Endausbeute bestimmt werden. Darüberhinaus ist das radioaktive JH-I-Derivat auch mit dem jeweiligen Detektor nachweisbar, in gleicher Menge, wie sie der errechneten Ausbeute entspricht und sofern JH-I in biologischen Proben nicht vorkommt. Die Differenz zwischen den beiden Ausbeutewerten lag immer unter 20 % des kleineren Wertes.

In einzelnen Fällen wurden geringe Hormonmengen (1 - 50 ng JH) di-

rekt umgesetzt und die Wiederfindungsrate analytisch bestimmt. Ebenso wurde bei biologischen Proben verfahren, wo die vor dem Homogenisieren zugesetzte Menge etwa dem mehr als 10fachen der natürlichen entsprach. Die so bestimmten Ausbeuten waren mit den durch Isotopenverdünnung bestimmten vergleichbar.

3. ALLGEMEINER TEIL

3.1 Hochdruckflüssigchromatographie

Die Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC oder schnelle Flüssigchromatographie, HSLC) ist eine Weiterentwicklung der Säulenchromatographie, speziell der Elutionschromatographie. Sie ist die Anwendung dieser Technik auf im wesentlichen analytische Probleme. Einander ähnliche Substanzen werden auf einer chromatographischen Säule umso besser getrennt, je kürzer die Diffusionswege sind, d.h. je kleiner und gleichmäßiger die Partikelgröße des Säulenfüllmaterials ist. Die Verwendung von Trägermaterial mit Durchmessern zwischen 40 und 5 μm setzt der flüssigen Phase so großen Widerstand entgegen, daß nur durch hohen Druck Durchflußraten von 0,15 bis 0,35 ml/min x mm² Querschnitt erreicht werden können, wie sie für eine gute und schnelle Trennung notwendig sind. In Verbindung mit hochempfindlichen Detektoren lassen sich geringste Substanzmengen (bis pg) ⁵³ analytisch nachweisen. Der Siemens Hochdruckflüssigchromatograph S200 stammt aus der Anfangsphase der Entwicklung dieser Trenntechnik. Es waren deshalb einige technische Änderungen erforderlich, von denen die wichtigste das Injektionssystem betraf. Die installierten Dosiersysteme (fest eingebaute, waagrecht liegende Spritze mit seitlicher Kanülenöffnung oder Dosierhahn) erlauben nur qualitatives Arbeiten. Beim Spritzen-System ist die Probenaufnahme in die Spritze äußerst problematisch. Die Dosierschleife hat für quantitatives Auftragen auf die Säule ein zu großes Totvolumen. Mit beiden Systemen lassen sich bei der Chromatographie einer definierten Probenmenge in nur einem Lauf

maximal 45 %, nach insgesamt dreimaliger Chromatographie, d.h. nach zweimaligem Spülen der Probengefäße, 75 % wiedergewinnen. Für präparativ-quantitative Reinigungen wurde deshalb ein Injektionssystem (ähnlich dem von Pearce ⁴⁵) gebaut, bei dem die Proben mit einer μ l-Spritze dosiert werden konnten. Besser eignete sich schließlich das septumlose Dosiersystem von Precision Sampling, weil damit die Spritzenkanüle nicht mit Septummateriale verstopfen kann. Mit beiden Systemen gelingt es auch bei Probenmengen weit unter 1 μ g, die Probe mit nur einer Injektion zu mehr als 95 % nach der Chromatographie wiederzugewinnen.

3.1.1 Trennung hydrophiler Verbindungen an Ionenaustauschern

Die Hochdruckflüssigchromatographie an Ionenaustauschern ist in ihrer Anwendungsbreite, wie z.B. auch die Gelchromatographie, begrenzt durch die Art der stationären Phase. Das bei den Untersuchungen eingesetzte Aminex A15 ist ein organisches Polymeres, in das ionische Gruppen eingebaut sind. Es wurde nur bis zu einem Druck von max. 110 bar belastet, weil die organische Matrix nur mäßig druckstabil ist. Die dadurch bedingten Probleme lassen sich weitgehend ausschalten, wenn die organische Ionenaustauschermatrix als dünne Schicht auf ein druckstabiles Material, z.B. Kieselgel, aufgebracht wird. Das bei den Trennversuchen verwendete AS-Pellionex SAX ist eine stationäre Phase dieser Art. Gegenüber den erstgenannten Ionenaustauschern haben letztere allerdings eine um den Faktor 10^3 geringere spezifische Austauschkapazität. Das hat zur Folge, daß man auch bei wesentlich längeren Säulen nur geringere Probenmengen chromatographieren kann. Carbonsäuren können im Eluat

mit dem UV-Detektor nur bei niedrigen Wellenlängen (<230 nm) nachgewiesen werden. Da ihr Extinktionskoeffizient auch bei dieser Wellenlänge klein ist, ist die Nachweisempfindlichkeit gering (μg -Bereich). Die Auswahl der möglichen Puffer ist auf solche beschränkt, die bei der gewählten Wellenlänge selbst nur schwach absorbieren. Zuckerphosphate lassen sich mit dem UV-Detektor nicht nachweisen. Für sie wurde ein Drahtdetektor verwendet, der einen Teil des Eluats einem Flammen-Ionisations-Detektor (FID) zuführt, mit dem dann die Verbindungen nachgewiesen werden.

3.1.1.1 Trennungen am Anionenaustauscher Aminex A15

An dem Anionenaustauscher Aminex A15 gelingt die Trennung von Verbindungen des Zuckerstoffwechsels und des Citronensäurezyklus. Sie dienen als Modellsubstanzen für die Chromatographie der stark polaren, hydrophilen und zum Teil sauren Fraktionen des Weiselfuttersafts, die im biologischen Test besondere determinierende Wirkungen gezeigt hatten ³. Säuren des Citratzyklus können an Aminex A15 mit einem Chlorid-/Phosphatpuffer zufriedenstellend getrennt werden. Ihre Retentionsvolumina liegen zwischen 10 und 90 ml (Tab. 1). Sie werden durch Erhöhung der NaCl-Konzentration verringert (Tab. 1, Spalte a gegenüber Spalte c). Die Auflösung der Peaks ist bei gleichem pH in besonderem Maße von der Phosphatkonzentration abhängig (Abb. 1 und 2, vgl. Tab. 1, Spalte b und c).

Tabelle 1: Retentionsvolumina (V_R in ml, $\pm 5\%$) von Mono-, Di- und Tricarbonsäuren bei Hochdruckflüssigchromatographie über Aminex A15 (Säule VI, s.S. 16) mit mobilen Phasen verschiedener Salzkonzentrationen, pH 8,0, a: 300 mM NaCl und 33 mM K/Na-Phosphat, b: 150 mM NaCl und 67 mM K/Na-Phosphat, c: 150 mM NaCl und 33 mM K/Na-Phosphat.

Säure	a	b	c
Glucuronsäure	1,9	2,1	2,2
Malonsäure	3,2	8,1	10,8
Citronensäure	3,2	16,5	24,4
Oxalessigsäure	8,3	10,2	11,0
Mesoxalsäure		28,3	36,4
Glutaconsäure		19,1	
Citraconsäure		10,9	
2-Oxoglutarsäure	7,3	23,0	28,0
Aconitsäure ⁺ (α)	7,3	36,0	57,0
(β)	9,7	57,0	89,0

⁺ cis-Aconitsäure isomerisiert in wässriger Lösung rasch zu cis- und trans-Aconitsäure, wobei letztere mengenmäßig überwiegt. Der größeren Peakfläche nach kann der Wert für (α) der trans-Aconitsäure entsprechen, (β) der cis-Form.

Wie Abb. 1 zeigt, werden 2-Oxoglutarsäure und Citronensäure sowie Oxalessigsäure und Malonsäure jeweils zugleich eluiert. Bei Verdopplung der Phosphatkonzentration auf 0,067 M lassen sich dann alle 4 Säuren mit unterschiedlich verringertem Retentionsvolumen getrennt nachweisen (Abb. 2). Das aus der cis-Aconitsäure entstehende Isomerengemisch ⁵⁴ wird in beiden Läufen vollständig getrennt.

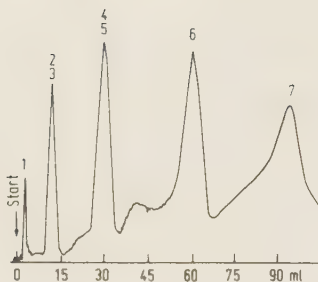


Abb. 1: Trennung von Mono-, Di- und Tricarbonsäuren auf Säule VI (Aminex A15, s.S. 16). Wäßrige mobile Phase mit 150 mM NaCl und 33 mM K/Na-Phosphat, pH 8,0, Flußrate 1,4 ml/min. 1 = D-Glucuronsäure, 2 = Malonsäure, 3 = Oxalessigsäure, 4 = Citronensäure, 5 = 2-Oxoglutar-säure, 6 und 7 = Aconitsäure. UV-Detektor 210 ± 10 nm.

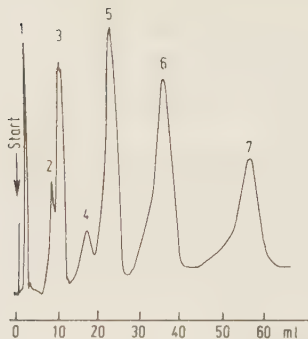


Abb. 2: Trennung der gleichen Probe wie in Abbildung 1 nach Verdopplung der Phosphatkonzentration (Säule VI, 150 mM NaCl, 67 mM K/Na-Phosphat, pH 8,0).

Als einen Vertreter der Polyhydroxymonocarbonsäuren chromatographierte man die D-Glucuronsäure mit. Sie wird, wie andere Verbindungen dieser Klasse, dicht hinter der Lösungsmittelfront mit sehr geringem Retentionsvolumen eluiert. Die Trennung solcher Verbindungen bzw. ihrer γ -Lactone gelingt unvollständig mit einem Puffer mit NaCl (50 mM) und Natriumhydrogenphosphat (33 mM) bei pH 8,0. Gluconsäure und Glucuronsäurelacton werden dabei nicht getrennt (Tab. 2).

Tabelle 2: Retentionsvolumina (V_R) und Auflösung (R_S) benachbarter Peaks einiger Polyhydroxymonocarbonsäuren und ihrer Lactone bei Chromatographie über Aminex A15, Säule VI (s.S. 16). Mobile Phase: 50 mM NaCl und 33 mM K/Na-Phosphat, pH 8,0.

	V_R [ml]	R_S^+
Gulonsäurelacton	2,2	1,0
Gluconsäure	3,5	-
Glucuronsäurelacton	3,6	0,5
Glucuronsäure	4,4	0,8
Gluconsäurelacton	6,1	

⁺ Die Auflösung R_S wurde in der üblichen Weise bestimmt [$R_S = 2(t_2 - t_1)/(w_1 + w_2)$]. War das nicht möglich, wurde sie anhand der Tabellen von Snyder⁵⁵ abgeschätzt.

Eine vollständige Trennung von Gluconsäure und Glucuronsäure ist mit reinem Phosphatpuffer (67 mM Na_2HPO_4 , pH 8,8) und einer um 20 cm längeren Säule (Säule VII, s.S. 16) möglich. Allerdings hat die niedrige Salzkonzentration große Retentionsvolumina und breite Peaks zur Folge (Tab. 3).

Mit abnehmendem pH verringern sich die Retentionsvolumina auf 9,5 bzw. 13,5 ml bei pH 6,6. Gleichzeitig sinkt die Auflösung auf den Wert von 1,3.

Tabelle 3: Retentionsvolumina (V_R) und Peakauflösung (R_S) für Gluconsäure (V_{R1}) und Glucuronsäure (V_{R2}) in Abhängigkeit vom pH des Eluens. Säule VII (Aminex A15, s.S. 16), 67 mM K/Na-Phosphat.

pH	V_{R1} [ml]	V_{R2} [ml]	R_S^+
8,85	14,4	22,2	2,06
8,3	12,8	19,4	1,86
7,8	11,1	16,9	1,84
7,3	10,1	15,0	1,63
7,1	9,9	14,7	1,60
6,9	9,6	13,8	1,55
6,6	9,5	13,3	1,30

⁺ vgl. Tab. 2

Phosphorylierte Zucker und Zwischenprodukte der Glykolyse können unter ähnlichen Bedingungen chromatographisch getrennt werden (Tab. 4). Dabei führt eine Erhöhung der Temperatur der Säule auf 50 ° neben einer Steigerung der Durchflußrate zu geringfügig verbesserten Trennungen. Spürbar besser wird die Trennung bei Verwendung einer 50 cm langen Säule (Säule VII, Tab. 4, V_{R2} und Abb. 3).

Tabelle 4: Retentionsvolumina (V_R) von phosphorylierten Kohlenhydraten bei 50 °C und einer mobilen Phase mit 18 mM NaCl und 30 mM K/Na-Phosphat, pH 4,7, auf einer 30 cm langen Säule (V_{R1}) und einer 50 cm langen Säule (V_{R2}), (Säulen VI und VII, s.S. 16).

Substanz	V_{R1} [ml]	V_{R2} [ml]
β -Glycerophosphat	17,7	29,0
α -Glycerophosphat	14,4	23,0
Glucose-6-phosphat	10,2	16,7
Glucose-1-phosphat	10,5	17,1
Fructose-6-phosphat	12,6	19,7
Fructose-1-phosphat	12,4	19,3
Ribose-5-phosphat	14,5	22,5

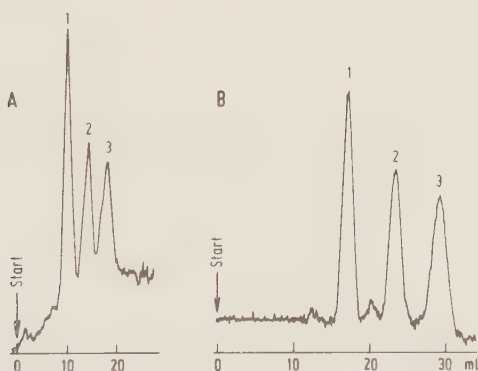


Abb. 3: Einfluß der Säulenlänge auf die Trennung von Zucker- und Glycerinphosphaten auf Aminex A15. 1 = Glucose-1-phosphat = Glucose-6-phosphat, 2 = α -Glycerophosphat, 3 = β -Glycerophosphat. Arbeitstemperatur 50 °C, wässrige mobile Phase mit 18 mM NaCl und 30 mM K/Na-Phosphat, pH 4,7. Substanznachweis durch Drahtdetektor mit FID. A: Säule VI, $v = 1,1$ ml/min. B: Säule VII, $v = 0,7$ ml/min (vgl. S. 16).

Die Isomerenpaare Fructose-1-phosphat und Fructose-6-phosphat sowie Glucose-1-phosphat und Glucose-6-phosphat werden mit Chlorid/Phosphat-Puffer auf Aminex A15 nicht getrennt. Dagegen ist die Trennung der beiden Glucosemonophosphate von den beiden Fructosemonophosphaten mit mäßiger Auflösung ($R_s = 0,5$) möglich; das ist ausreichend für eine eindeutige Identifizierung. Mit ca. dem 1,5-fachen Retentionsvolumen werden diese Verbindungen eluiert, wenn als mobile Phase eine 18 mM Kochsalzlösung verwendet wird. Das Fehlen des puffernden Phosphats macht sich in verstärktem Tailing bemerkbar.

Für die Elution der saureren Phosphorsäureester (Diphosphate, Glycerinsäurephosphat, Glycerinaldehydphosphat) in den Monophosphaten vergleichbarer Zeit benötigt man mit 100 mM Phosphat und 200 mM Chlorid wesentlich stärkere Pufferkonzentrationen (Tab. 5). Die in der Tab. 4 genannten Phosphate werden in diesem System mit Retentionsvolumina von 3,9 bis 6,5 ml eluiert.

Tabelle 5: Retentionsvolumina (V_R) saurer Phosphate des Zuckerstoffwechsels über eine 50 cm lange Säule (Säule VII, s.S. 16). Mobile Phase: 200 mM NaCl und 100 mM K/Na-Phosphat, pH 4,9, 50 °C.

Substanz	V_R [ml]
DL-Glycerinaldehyd-3-phosphat	11,5
Fructose-1,6-diphosphat	28,8
Glucose-1,6-diphosphat	22,2
Glycerat-3-phosphat	43,0

Alle vier Verbindungen werden so weit voneinander eluiert, daß die Peaks vollständig getrennt sind. Bei der Chromatographie von vorgereinigten Extrakten aus Bombyx-Puppen mit determinierender Wirkung werden Substanzen mit den Retentionsvolumina von α -Glycerophosphat und β -Glycerophosphat eluiert.

3.1.1.2 Trennungen am Anionenaustauscher AS-Pellionex SAX

Beim chromatographischen Nachweis von Verbindungen ist die Identifizierung umso sicherer, je mehr unterschiedliche chromatographische Systeme benutzt werden. Neben der Variation der mobilen Phase wird das auch bei Verwendung verschiedener stationärer Phasen erreicht. Die Struktur des Pellionex SAX erlaubt die Anwendung anderer Arbeitsbedingungen als Aminex, insbesondere höheren Druck und größere Durchflußraten. Trotz gleichen Bauprinzips des eigentlichen Ionenaustauschmaterials sind andere Eigenschaften für die Trennung zu erwarten. So werden darauf Säuren des Citratzyklus in anderer Reihenfolge eluiert als auf Aminex. Zum Beispiel hat 2-Oxoglutarsäure ein viel geringeres Retentionsvolumen als Citronensäure (12,5 ml bzw. 31 ml, Säule V mit 50 mM K/Na-Phosphat, pH 5, als mobile Phase). Cis-Aconitsäure dagegen wird wie über Aminex am stärksten retardiert.

Die Trennung der Hexosemonocarbonsäuren von den Verbindungen des Zuckerstoffwechsels ist nicht möglich. Diese Verbindungen werden alle von der 50 cm-Säule sehr dicht hinter der Front eluiert, selbst bei Verwendung reinen Wassers oder von Wasser/Methanolgemischen. Mit der 165 cm langen Säule (Säule IV, s.S. 16) kann man mit sehr schwachen Salzkonzentrationen (0,5 mM NaCl, 1 mM

K/Na-Phosphat) und schwach saurer mobiler Phase (pH 5,0) eine deutliche Abtrennung dieser Substanzen von der Front erreichen (V_R ca. 15 - 20 ml), nicht jedoch ihre Trennung untereinander. Erst bei einem pH unter 4 (3,8 und 2,8) gelingt die eindeutige Abtrennung der Glyceromonophosphate von Hexosemonophosphat (V_R β -Glycerophosphat 8,95 ml, V_R Glucose-1-phosphat 7,1 ml, pH 2,8). Bei der Trennung der drei isomeren Dicarbonsäuren Citraconsäure, Itaconsäure und Glutaconsäure auf einer 50 cm Säule (Säule V, s. S. 16) zeigt sich besonders deutlich, daß Pellionex SAX neben dem Ionenaustauschereffekt noch andere Wechselwirkungen auf die Substanzen ausübt. Die Trennung erreicht ihr Optimum mit einem 50 mM Phosphatpuffer bei pH 5,0 oder 4,0 (Abb. 4).

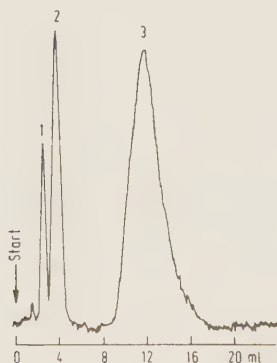


Abb. 4: Trennung der drei isomeren Dicarbonsäuren Itaconsäure (Peak 1, 0,8 μ g), Glutaconsäure (Peak 2, 1,2 μ g) und Citraconsäure (Peak 3, 1,8 μ g) auf Säule V (s.S. 16). Mobile Phase: 50 mM K/Na-Phosphat, pH 4,0, $v = 1,2$ ml/min.

Bei einem reinen Ionenaustauschereffekt sollte sich die Verweildauer der Verbindungen auf der Säule bei Veränderung des pH zwar nicht im gleichen Maße, wohl aber im gleichen Sinne verändern. Das ist bei diesen drei Dicarbonsäuren nicht der Fall (Tab. 6).

Für die Citraconsäure nimmt das Retentionsvolumen mit sinkendem pH stark zu. Bei der Itaconsäure erreicht es ein schwach ausgeprägtes Maximum bei pH 5.

Tabelle 6: pH-Abhängigkeit der Retentionsvolumina (V_R in ml) der drei isomeren Säuren Citraconsäure (C), Itaconsäure (I) und Glutaconsäure (G) bei Chromatographie über Pellionex SAX (Säule V, s.S. 16). Mobile Phase: 50 mM K/Na-Phosphat). Zum Vergleich 2-Oxoglutarsäure (O) und Mesoxalsäure (M).

pH	C	I	G	O	M
7,0	2,7	3,2	3,5	4,1	2,6
6,0	4,9	4,1	4,6	6,4	3,7
5,0	10,7	5,2	10,4	12,0	18,0
4,0	12,3	3,3	4,2	6,3	14,5
pK _{a1}	2,29	3,85	3,74	2,47	2,85

Bei der Glutaconsäure ist dieses Maximum viel stärker ausgeprägt. Bei pH 7 entspricht ihr Retentionsvolumen dem der Itaconsäure, bei pH 5 dem der Citraconsäure und bei pH 4 liegt es wieder näher an dem der Itaconsäure. Dieses uneinheitliche Verhalten der drei Dicarbonsäuren mit ähnlichen Dissoziationskonstanten ist nur erklärbar, wenn man neben der Ionenaustauscherwirkung weitere Wechselwirkungen der Substanzen mit Pellionex SAX annimmt.

In Proben biologischen Materials (Bombyx-Extrakt mit determinierender Wirkung) wurde geprüft, ob Chinasäure vorhanden ist. Gaschromatographische Untersuchungen hatten ihr Vorhandensein wahr-

scheinlich erscheinen lassen. Auch bei der Trennung über Aminex A15 war von diesem Extrakt Material mit gleichem V_R wie das der Chinasäure eluiert worden. Auf Pellionex hat diese ein V_R von $8,5 \pm 0,1$ ml (1 mM K/Na-Phosphat, 0,5 mM NaCl, pH 5,0, Säule IV). Bei der Chromatographie biologischer Proben wird keine Substanz in diesem Retentionsbereich eluiert. Um Nebeneffekte auszuschliessen - so nehmen die Retentionsvolumina generell mit zunehmender Probenmenge deutlich ab - wurde zusammen mit der biologischen Probe Chinasäure injiziert. Sie wird auch in diesem Falle mit dem gleichen V_R wie bei alleiniger Injektion nachgewiesen.

Mit den beiden starken Anionenaustauschern Aminex A15 und AS Pellionex SAX ist es möglich, Verbindungen des Kohlenhydratstoffwechsels und Substanzen ähnlicher Struktur und Acidität untereinander oder nur in Verbindungsklassen chromatographisch zu trennen. Mit Aminex A15, inzwischen vom Hersteller ersetzt durch das feinkörnigere Material Aminex A27, und geeigneten Puffern kann man sowohl die Tricarbonsäuren des Citratcyclus, als auch die wenig aciden On- und Uronsäuren trennen. Soweit die Peakauflösung unvollständig ist, sollte die völlige Trennung benachbarter Peaks durch Verlängerung der Säule möglich sein (vgl. Abb. 3). Da die Ionenaustauschermatrix eine weitere Druckerhöhung nicht zulässt, kann man nur die Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase verringern. Eine "schnelle" Flüssigchromatographie ist dann nicht mehr möglich. Ein zusätzlicher Nachteil des Aminex ist seine Eigenschaft, abhängig von der Eluenszusammensetzung zu quellen bzw. zu schrumpfen. Deshalb läßt sich die Gradientenelution kaum an-

wenden. An AS Pellionex SAX lassen sich On- und Uronsäuren nicht trennen. Di- und Tricarbonsäuren sind trennbar. Die Struktur des Materials erlaubt hohe Fließgeschwindigkeiten bei niedrigem Druck (z.B. 0,8 ml/min bei 50 bar mit Säule IV) und damit die Verwendung langer Säulen. Die geringe Austauschkapazität beschränkt die Anwendung ganz auf analytische Probleme. Die chemische Stabilität ist noch unbefriedigend, da das Pellionex SAX schon bei 60 °C im UV absorbierendes Material in die mobile Phase abgibt.

Für die chromatographische Trennung von sauren oder basischen Verbindungen wurden inzwischen die Ionenaustauscher durch Materialien mit Umkehrphasen (reversed phase) weitgehend ersetzt. Diese erlauben die Chromatographie saurer, neutraler und basischer Verbindungen auf dem gleichen Säulenmaterial. Ionische Verbindungen werden dabei als "Ionenpaare" chromatographiert. Die Umkehrphasen-Ionenpaarchromatographie ist nach neueren Überlegungen⁵⁶ in ihrem Trennprinzip der Ionenaustauschchromatographie wieder vergleichbar.

3.1.2 Adsorptionschromatographie der Juvenilhormone und ihrer Derivate an Kieselgel

Für die chromatographische Trennung von lipophilen Substanzen eignet sich besonders gut die Adsorptionschromatographie. Sie ist, solange die vorliegenden Trennprobleme damit gelöst werden können, der Flüssig-flüssig-Verteilungschromatographie vorzuziehen, da bei dieser die technischen Probleme (Auswaschen stationärer flüssiger Phase) größer sind. Bei der Adsorptionschromatographie unter erhöhtem Druck wird insbesondere Kieselgel und

Aluminiumoxid verwendet. Für die Trennung der Juvenilhormone und ihrer Derivate ist das Aluminiumoxid wenig geeignet, weil es daran bereits zur Öffnung des Oxiranrings oder zu Isomerisierungen kommen kann⁴⁶. Für die Trennung und Identifizierung der Juvenilhormone reichen kurze Standardsäulen (25 und 30 cm) aus (Abb. 5, Tab. 7,8).

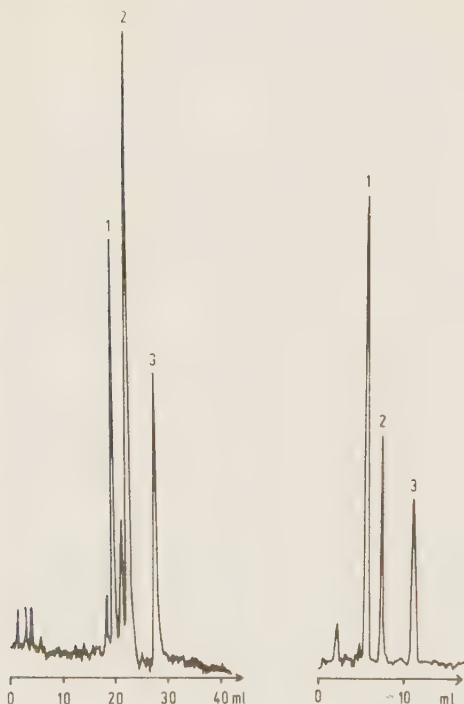


Abb. 5: (links) Trennung der Juvenilhormone über Säule Ia (Kieselgel, s.S. 15), Flußrate $v = 2,0$ ml/min. 1 = JH-I, 2 = JH-II, 3 = JH-III. Die Signale vor JH-I und JH-II stammen von den entsprechenden all-trans-Isomeren, die bei der Synthese als Nebenprodukt zu etwa 17 % entstehen (vgl. S. 73). UV-Detektor 218 ± 10 nm.

Abb. 6: (rechts) Chromatogramm einer Trennung von (2,4-Dichlorbenzoyloxy)-JH-Derivaten (JH-DCB) auf Säule Ic (s. S. 15) und der Referenz Dibutylphthalat (DBP), $v = 1,5$ ml/min. 1 = DBP, 2 = JH-I-DCB, 3 = JH-III-DCB. UV-Detektor 218 ± 10 nm.

In Abb. 5 erkennt man, daß die Signale von JH-I und JH-II vollständig aufgelöst wären, wenn nicht dazwischen das JH-II-all-trans-Isomere eluiert würde. Der Abstand zwischen JH-II und JH-III ist so groß, daß ein Überlappen beider Juvenilhormone im Eluat aus-

zuschließen ist. Bei der Reinigung biologischer Proben wurde in der Regel das Eluat über den gesamten Bereich, in dem die Juvenilhormone oder ihre Derivate eluiert werden, gesammelt. Ihre Konzentration ist aber so gering, daß sie nicht mit dem UV-Detektor - und wohl kaum mit einem anderen HPLC-Detektionssystem - erkannt werden können. So ist im Chromatogramm der Abb. 20 im Bereich der Fraktionen 10 und 11, die insgesamt 5,9 pmol JH-III-HFB-Derivat enthalten, kein entsprechender Peak erkennbar. Die Nachweisgrenze mit dem UV-Detektor liegt für Juvenilhormon bei ca. 150 pmol. Die Trennungen der unpolaren Sesquiterpenoide (Juvenilhormon und aus ihnen gebildete Ether und Ester) gelingt mit n-Hexan als Eluens und Ether (6 oder 8 %) als polare Komponente. Die Verwendung anderer Alkane (Cyclohexan, Pentan, Heptan) ist möglich und führt nur zu geringfügigen Änderungen der Trenndaten. Die Retentionsvolumina der Juvenilhormone und ihrer Derivate vergleichbarer Polarität sind in der Tabelle 7 zusammengestellt. Sie sind reproduzierbar und so verschieden, daß sie zur Identifizierung des jeweiligen Juvenilhormons oder Juvenilhormonderivats herangezogen werden können. Derivate vom JH-II waren nur in wenigen Fällen hergestellt worden (vgl. S. 60).

Tabelle 7: Retentionsvolumina ($V_R \pm 2\%$) von Juvenilhormonen und deren Derivaten auf Kieselgel, Säule I (s.S. 15). Die Durchflußraten schwankten je nach Meßserie zwischen 1,6 - 1,75 ml/min (Säule I a) bzw. 1,5 - 1,65 ml/min (Säule I b).

Verbindungen		Säule:	I a	I b
Nr.	Name		V_R [ml]	V_R [ml]
[1]	JH-I		19,5	12,9
[2]	JH-II		22,3	16,0
[3]	JH-III		27,2	19,2
[4]	JH-III-Et (Ethyl-10,11-epoxyfarnesoat)		-	17,1
[31]	10,11-bis(Trifluoracetyloxy)-JH-I		10,8	-
[32]	10,11-bis(Trifluoracetyloxy)-JH-III		14,7	-
[33]	10,11-bis(Heptafluorbutyryloxy)-JH-I		8,0	5,5
[34]	10,11-bis(Heptafluorbutyryloxy)-JH-III		10,3	8,3
[37]	10-Heptafluorbutyryloxy-dehydrato-JH-I ⁺		3,6	-
	10-Trifluoracetyloxy-dehydrato-JH-I ⁺		4,2	-
[38]	10-Heptafluorbutyryloxy-dehydrato-JH-III ⁺		4,5	-
[35]	10-Hydroxy-11-heptafluorbutyryloxy-JH-I ⁺		74,0	40,6
[27]	10-(2,4-Dichlorbenzoyloxy)-11-methoxy-JH-I		-	13,2
[28]	10-(2,4-Dichlorbenzoyloxy)-11-methoxy-JH-II		-	15,5
[29]	10-(2,4-Dichlorbenzoyloxy)-11-methoxy-JH-III		35,0	21,2
[30]	10-Pentafluorbenzoyloxy-11-methoxy-JH-III		17,4	-
[26]	10-Heptafluorbutyryloxy-11-methoxy-JH-III		13,1	9,8
[25]	10-Heptafluorbutyryloxy-11-methoxy-JH-II		9,4	7,0
[24]	10-Heptafluorbutyryloxy-11-methoxy-JH-I		8,0	5,6
[10]	10-Hydroxy-11-nonafluorhexoxy-JH-III		-	66,5
Standardsubstanzen				
	Dibutylphthalat		10,5	8,1
	bis(2-Ethylhexyl)-phthalat		5,4	4,4

⁺ Die Struktur dieser Verbindungen, besonders die Stellung der Substituenten und die Lage neu entstandener Doppelbindungen, ist nicht gesichert (vgl. S. 63).

Die Trennung der JH-I- und JH-III-Derivate ist in allen Fällen so gut (vgl. Abb. 6 und 7), daß eine vollständige Auflösung der Peaks vom JH-I- und JH-II-Derivat anzunehmen ist, etwa im gleichen Maße wie bei den Juvenilhormonen (Abb. 5) oder den JH-HFB-Derivaten (Abb. 8).



Abb. 7: Flüssigchromatogramm von 10-Hydroxy-11-methoxy-JH-Derivaten (JH-OMe) und der Referenzsubstanz Triphenylmethanol (TPM). Säule III a (s.S. 15), Flußrate 1,88 ml/min. 1 = JH-I-OMe, 2 = TPM, 3 = JH-III-OMe. Das Retentionsvolumen des JH-II-OMe ist etwas kleiner als das des TPM.
UV-Detektor 218 ± 10 nm.



Abb. 8: Chromatogramm der 10-Heptafluorbutyryloxy-11-methoxy-Juvenilhormone (JH-HFB) und von Referenzsubstanzen. Säule I a (s.S. 15), Flußrate 1,45 ml/min. 1 = Lösungsmittelfront, 2 = bis(2-Ethylhexyl)-phthalat, 3 = JH-I-HFB, 4 = JH-II-HFB, 5 = Dibutylphthalat, 6 = JH-III-HFB
UV-Detektor 218 ± 10 nm.

Mit n-Hexan / 8 % Ether als Eluens ist die Trennung dieser Verbindungen noch so gut, daß jedes einzelne Juvenilhormon oder Juvenilhormonderivat getrennt gesammelt werden kann. Die höhere Polari-

tät dieser mobilen Phase verkürzt die Dauer eines Chromatographie-
laufs und verringert die Peakbreite (vgl. Abb. 20, S. 83). Das
wiederum ermöglicht es, bei präparativen Läufen weniger Eluatvo-
lumen aufzufangen.

Bei Verbindungen, die in diesem Eluens noch Retentionsvolumina
von mehr als 20 ml besitzen, ist die weitere Erhöhung der Pola-
rität sinnvoll. Die Trennung von Dichlorbenzoyloxy-JH-Derivaten
im System I c zeigt die Abbildung 6. Die Elution der polareren
JH-Derivate mit einer freien Hydroxygruppe und langem Alkoxy-
rest am C-10 bzw. C-11 gelingt in vertretbarer Zeit überhaupt
erst mit diesem Eluens (Abb. 9).

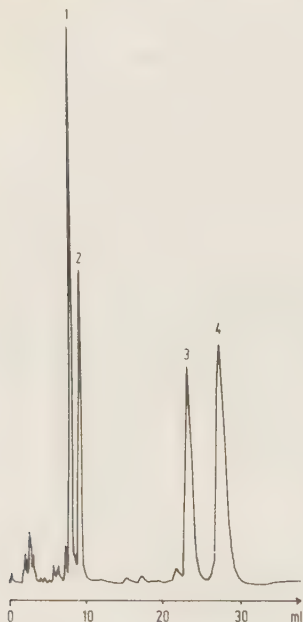


Abb. 9: Flüssigchromatogramm der Ho-
mologen JH-III-Et (Peak 1) und JH-III
(Peak 2) und ihrer Nonafluorhexanol-
Addukte. Säule I c (s.S. 15), Flußrate
1,5 ml/min. 3 = 10-Hydroxy-11-nona-
fluorhexoxy-JH-III-Et, 4 = 10-Hydroxy-
11-nonafluorhexoxy-JH-III.
UV-Detektor 218 ± 10 nm.

Wie man aus dieser Abbildung erkennt, erlaubt die Auflösung der
Peaks von JH-III-Et und JH-III auch hier noch die quantitative

Trennung und eine eindeutige Zuordnung dieser sehr ähnlichen Verbindungen. Ein weiteres Chromatogramm ist in Abb. 14 dargestellt, wo besonders die Mengenverhältnisse der Produkte nach der NFH-Addition an JH-I interessierten. Die Retentionsvolumina aller in diesem System vermessenen Verbindungen enthält Tabelle 8.

Tabelle 8: Retentionsvolumina (V_R , $\pm 2\%$) von Juvenilhormonen und den polareren JH-Derivaten bei Chromatographie über Säule I c (s.S. 15, 12 % Ether in n-Hexan). Flußrate: 1,5 - 1,6 ml/min.

Verbindungen		V_R [ml]
Nr.	Name	
[1]	JH-I	6,5
[3]	JH-III	9,0
[4]	JH-III-Et	7,7
[27]	10-(2,4-Dichlorbenzoyloxy)-11-methoxy-JH-I	6,4
[29]	10-(2,4-Dichlorbenzoyloxy)-11-methoxy-JH-III	9,2
[18]	10-Hydroxy-11-nonafluorhexoxy-JH-I-1	15,2
[22]	10-Hydroxy-11-nonafluorhexoxy-JH-II-1	15,8
[23]	10-Nonafluorhexoxy-11-hydroxy-JH-III ⁺	16,5
[19]	10-Hydroxy-11-nonafluoroctoxy-JH-I-1	15,6
[17]	10-Hydroxy-11-octoxy-JH-I	6,6
[9]	10-Hydroxy-11-octoxy-JH-III	10,8
[19]	10-Hydroxy-11-nonafluoroctoxy-JH-I-2	20,7
[18]	10-Hydroxy-11-nonafluorhexoxy-JH-I-2	23,0
[22]	10-Hydroxy-11-nonafluorhexoxy-JH-II-2	24,4
[10]	10-Hydroxy-11-nonafluorhexoxy-JH-III	27,0
[13]	10-Hydroxy-11-nonafluorhexoxy-JH-III-Et	22,3
[11]	10-Hydroxy-11-nonafluorhexoxy-JH-III	26,3
	Dibutylphthalat	5,3

⁺ siehe Tabelle 7

Bei keinem anderen untersuchten JH-Derivat ist der Unterschied der Elutionsvolumina zwischen JH-I- und JH-III-Derivat so groß und zwischen JH-I- und JH-II-Derivat so klein wie bei den Nonafluorhexanol- und -octanoladdukten. Da auch das NFH-Derivat des JH-II-Isomeren JH-III-Et, das strukturell aber dem JH-III vergleichbar ist, mit ähnlich großem Volumen (22 ml) wie das JH-III-NFH eluiert wird, ist anzunehmen, daß die C-11-Ethylgruppierung des JH-I und -II die Hydroxygruppe am C-10 viel stärker für die Adsorption am Kieselgel abschirmt, als das die Methylgruppen des JH-III und JH-III-Et tun. Möglicherweise besteht der gleiche, durch die räumliche Anordnung der C-11-Ethylkette bedingte Zusammenhang auch zwischen Struktur (vgl. S. 72) und hohem Wert für das Retentionsvolumen der Verbindungen JH-I-NFH-2 und JH-II-NFH-2 (vgl. Abb. 14 und Abb. 9). Nahezu gleiche chromatographische Daten erhält man von den Nonafluoroctanolderivaten. Die Trennung der polaren JH-Derivate (eine oder mehrere OH-Gruppen, kurzer Alkoxyrest) gelingt, wenn man Methanol (1 oder 2 %) als polare Komponente in der mobilen Phase verwendet (Tab. 9 und 10). Mit 2 % Methanol in n-Hexan lassen sich die H₂O-Addukte der Juvenilhormone und ihre Verseifungsprodukte in ausreichend kurzer Zeit eluieren (Tab. 9). 1 % Methanol reicht aus, um die 10-Hydroxy-11-methoxy-Juvenilhormone zu chromatographieren (Tab. 10). Das JH-II-Methanoladdukt wird fast zugleich mit dem externen Standard Triphenylmethanol eluiert (vgl. Abb. 7 und Tab. 10).

Tabelle 9: Retentionsvolumina (V_R , $\pm 2\%$) der polaren Juvenil-hormonderivate auf Säule III b, $v = 2,2 - 2,5$ ml/min.

Verbdg. Nr.	Name	V_R [ml]
[14]	10,11-Dihydroxy-JH-I	27
[35]	10-Hydroxy-11-heptafluorbutyryloxy-JH-I ⁺	9,2
[36]	10-Hydroxy-11-heptafluorbutyryloxy-JH-III ⁺	12,2

⁺ vgl. Tabelle 7

Tabelle 10: Retentionsvolumina (V_R , $\pm 2\%$) der polaren Juvenil-hormonderivate auf Säule III a, $v = 1,6 - 1,7$ ml/min.

Verbdg. Nr.	Name	V_R [ml]
[15]	10-Hydroxy-11-methoxy-JH-I	9,8
[21]	10-Hydroxy-11-methoxy-JH-II	10,7
[6]	10-Hydroxy-11-methoxy-JH-III	12,7
[29]	10-(2,4-Dichlorbenzoyloxy)-11-methoxy-JH-III	5,2
Standardsubstanzen		
	o-Nitrophenol	4,8
	Triphenylmethanol	11,3

Für die chromatographische Reinigung von Juvenilhormonderivaten aus biologischen Extrakten ist es besonders wichtig, jede Möglichkeit der Verunreinigung der zu untersuchenden Proben mit synthetischem Material, das zur Kalibrierung der Säule verwendet wird, auszuschließen. Die Gefahr ist besonders groß, weil für die Fest-

stellung der Retentionsvolumina μg -Mengen synthetischer Verbindungen verwendet werden müssen, im biologischen Material aber nur ng -Mengen vorhanden sind. Für die Chromatographie biologischer Proben mußten deshalb Eichsubstanzen gefunden werden, die die quantitative Juvenilhormonbestimmung nicht beeinflussen können. Auf der Stufe der 10-Hydroxy-11-methoxy-Juvenilhormone war dafür das Triphenylmethanol geeignet, dessen Wert für das Retentionsvolumen (Tab. 10) fast dem des JH-II-Derivats entspricht. Bei der anschließenden HPLC der 10-Ester-11-methoxy-Juvenilhormonderivate (Abb. 6 und 8) waren dafür die Weichmacher Dibutylphthalat und bis(2-Ethylhexyl)-phthalat geeignet. Bis(2-Ethylhexyl)-phthalat wird vor, das Dibutylphthalat genau zwischen den JH-HFB-Derivaten eluiert (Abb. 8). Da beide Weichmacher im biologischen Material immer vorhanden sind (vgl. Abb. 20), sind sie gute Referenzsubstanzen für den Elutionsbereich der JH-Derivate, die in so geringer Konzentration in der Probe vorhanden sind, daß sie mit dem UV-Detektor nicht nachweisbar sind.

3.2 Derivatisierung von Juvenilhormonen

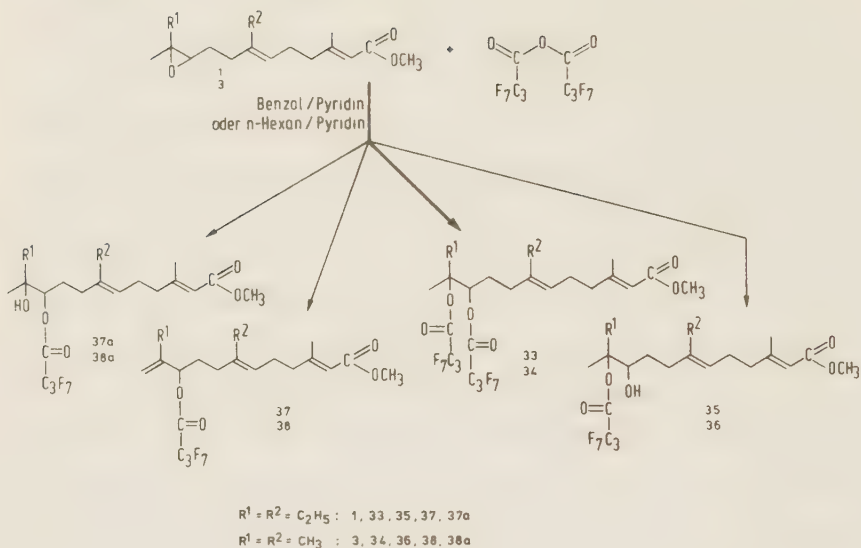
Erste Ergebnisse aus dem Galleriatest hatten gezeigt, daß in den verschiedenen Entwicklungsstadien der Honigbiene nur eine geringe Juvenilhormonkonzentration zu erwarten ist, wenn man die Galleria-Aktivität in JH-I-Menge umrechnet. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Methoden zu finden, die es trotz des niedrigen Hormontiters und des nur in begrenzten Mengen zur Verfügung stehenden Ausgangsmaterials ermöglichen, die Art des in der Biene vorkommenden Juvenilhormons zu bestimmen und den Hormontiter zu messen. Der direkte Nachweis von synthetischem Juvenilhormon gelingt - unspezifisch - mit dem UV-Detektor bei der HPLC bis hinab zu ca. 50 ng. Für die eindeutige Identifizierung im Massenspektrometer mit Elektronenstoßionisation und nach gaschromatographischer Trennung waren mindestens 500 ng erforderlich. Die Massenspektren der Juvenilhormone zeigen keine intensiven Fragmente im Massenbereich $m/e > 200$, die für das Verfahren der Massenfragmentographie erfolgversprechend wären (vgl. Abb. 23A). Empfindlicher ist die Methode von Trautmann et al.⁴², mit der es gelingt, Juvenilhormon bis zu 1,6 ng (5,7 pmol) pro Injektion, bzw. 0,15 µg pro Probe mit Hilfe der Kapillargaschromatographie nachzuweisen. Wesentlich spezifischer ist das Verfahren von Lanzrein et al.¹¹, bei dem die Juvenilhormone nach Gaschromatographie und chemischer Ionisation mit Isobutan im Massenspektrometer mit der Methode der Massenfragmentographie nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze liegt bei 10 ng (36 pmol) pro Injektion. Mit beiden Methoden scheint die unterste Nachweisgrenze für die Identifizierung der Juvenilhormone erreicht. Sie kann jedoch mit geringeren Mengen

gelingen, wenn man die Juvenilhormone so derivatisiert, daß sie mit entsprechenden, empfindlicheren und möglichst selektiven Detektoren in geringsten Konzentrationen noch nachweisbar sind. Solche Derivatisierungen sind vielfach möglich: Einführung eines Chromophors zur Erhöhung der Signalintensität im UV- oder Fluoreszenzdetektor des HPLC-Systems. Derivatisierung mit einem Elektrophor für den Nachweis mit Elektroneneinfang-Detektor (ECD), mit Phosphorverbindungen für die Identifizierung im Alkali-Flammen-Ionisations-Detektor (auch N-P-Detektor genannt) und Veränderung des Moleküls in der Weise, daß das Massenspektrometer als spezifischer Detektor höchste Nachweisempfindlichkeit erreicht. Dabei geht der Substanzerkennung bei allen Verfahren eine chromatographische Trennung voraus. Intensiv verfolgt wurden in der vorliegenden Arbeit Derivatisierungen für den Nachweis mit dem GC-ECD- und GC-MS-System. Da vom JH-II insgesamt nur 1 mg zur Verfügung stand, wurden davon Derivate nur dann hergestellt, wenn die Umsetzung von JH-III und JH-I und der analytische Nachweis ihrer Reaktionsprodukte erfolgversprechend verlaufen waren.

3.2.1 Darstellung von JH-10,11-bis-HFB-Estern

Die Juvenilhormone besitzen mit dem Oxiranring eine reaktive Gruppe, die einer Derivatisierung leicht zugänglich sein sollte. Die säurekatalysierte Addition von Wasser⁵¹ ist dabei die einfachste Reaktion. Vom entstandenen 10,11-Diol ausgehend, lassen sich dann bis-Ester perfluorierter Verbindungen darstellen. Diesen Weg beschreibt Broekhoven et al.⁴³ für JH-III (Veresterung mit Heptafluorbuttersäureanhydrid) und später (mit Trifluoressigsäureanhydrid) Blight und Wenham¹².

Die geringste noch nachweisbare Menge JH-III-10,11-bis-HFB-ester betrug bei Broekhoven et al. 37 fmol/Injektion. Eigene Synthesen, vorwiegend mit JH-I, verliefen aber wenig erfolgversprechend. Vor allem war der erste Schritt, die vollständige Umwandlung des Juvenilhormons zum JH-Diol (Verbindung [5], [14], [20]), nicht immer nachvollziehbar. Mit Submikrogrammengen unterlagen die Ausbeuten starken Schwankungen. Zu dem gleichen Befund gelangten Schooley et al.⁵⁷, die dies auf eine Bevorzugung von Umlagerungen am JH-Molekül zurückführen. Auch die Veresterung mit Heptafluorbuttersäureanhydrid (HFBA) verlief nicht quantitativ. Sie führte immer auch zur Bildung der im Folgenden beschriebenen Nebenprodukte. Es wurde deshalb versucht, auf die Darstellung des JH-Diols zu verzichten und Heptafluorbuttersäureanhydrid (HFBA) und Trifluoressigsäureanhydrid direkt an JH zu koppeln. Da die Reaktionen mit beiden Säureanhydriden prinzipiell zu vergleichbaren Ergebnissen führten, wird nur die Umsetzung mit HFBA beschrieben. Die dabei im wesentlichen entstehenden Produkte sind im Schema 2 dargestellt.



Schema 2

Die Reaktion verläuft nicht quantitativ in eine Richtung: neben den Produkten [33] bzw. [34] (max. 80 % von [1] oder [3]) entstand immer mindestens zu 10 % [37] bzw. [38], gelegentlich bis über 30 % [35] bzw. [36]. Die Bildung dieser Verbindungen ließ sich auch nicht verhindern, wenn als Lösungsmittel wassergesättigtes n-Hexan (neben Pyridin und Benzol) oder als Reagenz ein Gemisch aus Heptafluorbuttersaure (HFBS) und HFBA verwendet wurde.

Abb. 10 zeigt das durchschnittliche Verhältnis der beiden Produkte [38], (Peak 1) und [34], (Peak 2) bei gaschromatographischer Trennung, aufgenommen mit dem FID (unten) und dem Totalionenstrom des Massenspektrometers (oben).

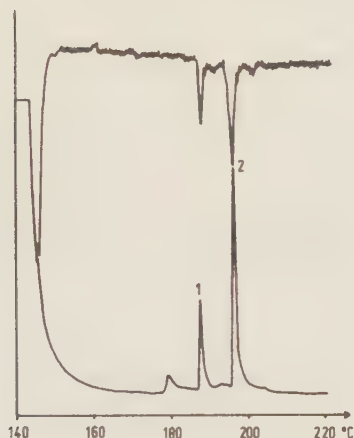


Abb. 10: Gaschromatogramme der Reaktionsprodukte von JH-III mit HFBA (vgl. S. 59). Das untere Chromatogramm wurde mit dem FID aufgenommen, das obere zeigt den Totalionenstrom im Massenspektrometer. 1 = JH-III-dehydrato-HFB [38], 2 = JH-III-bis-HFB [34]. Säule 2 m x 2 mm i.D., 3 % SE 30 auf Gaschrom Q, Gasfluß 30 ml He/min, Ofen 140 °C + 10 °/min.

Die Extreme in den Ausbeuten an [34] sind in Abb. 11 erkennbar, wo in 11A und 11B Gaschromatogramme zweier nahezu paralleler Reaktionsansätze dargestellt sind. Abb. 11C zeigt das der Abb. 11B entsprechende Flüssigchromatogramm. Die für [37], [38] und [35], [36] vorgeschlagenen Strukturen werden durch massenspektrometrische und flüssigchromatographische Befunde gestützt. Ein nahezu gleiches Massenspektrum (am Beispiel der Produkte vom JH-I) wie von [37] (m/e 490 = 2,7 %, M^+) wäre auch von Verbindung [37a] zu erwarten, da bei allen untersuchten JH-Derivaten mit einer Hydroxygruppe am C-11 kein Moleküllion, sondern nur M-18 und die davon zu erwartenden Folgefragmente zu finden sind (vgl. Dunham et al.⁵⁸).

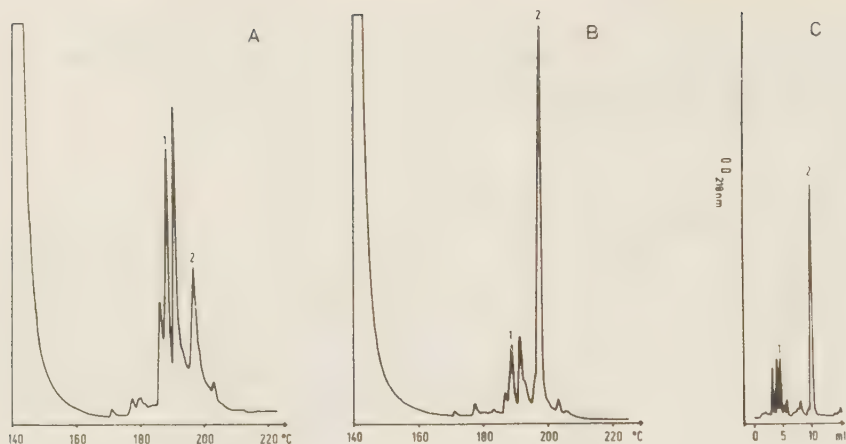


Abb. 11: Chromatogramme von Reaktionsansätzen von JH-III mit HFBA. 1 = JH-III-dehydrato-HFB [38], 2 = JH-III-bis-HFB [34]. Die den anderen Peaks entsprechenden Verbindungen wurden nicht identifiziert. GC-Bedingungen wie in Abb. 10. A: Gaschromatogramm eines Reaktionsansatzes mit unbefriedigender Ausbeute. B: Gaschromatogramm eines Ansatzes mit optimaler Ausbeute. C: Flüssigchromatogramm des gleichen Ansatzes wie in B. Säule I a (s.S. 15), Durchfluß 1,6 ml/min, UV-Detektor 218 ± 10 nm. Reaktionsbedingungen für B s.S. 21, für A wie bei B, jedoch statt 30 μ l Benzol + 15 μ l Pyridin, 50 μ l Benzol/20 % Pyridin.

Das äußerst kleine Retentionsvolumen bei HPLC mit Säule I a (vgl. Tab. 7) spricht aber gegen eine freie OH-Gruppe in diesem Molekül. Die Lage der neu entstandenen Doppelbindung ist nicht festgelegt. In Verbindung [35] hat das Molekülion M^+ (m/e 508) im Massenspektrum eine rel. Intensität von 7 % und der Isotopenpeak (m/e 509) von 1,8 %. Das sind 26 % der Intensität des M^+ , was dem errechneten Wert von 24,2 % nahekommt. $M^{+}-18$ (m/e 490) hat mit 1,0 % deutlich geringere Intensität als das M^+ von [37]. Die aus beiden Molekülionen durch Verlust von OCH_3 (aus der Estergruppe) jeweils

entstehenden Fragmente sind mit m/e 477 (1,1 %) nur bei [35] und mit m/e 459 (1,6 %) nur bei [37] nachzuweisen. Erst die Fragmente mit m/e 276 (Abspaltung von HFBS aus den Ionen mit m/e 490) weisen mit 16 % bei [37] und 21 % bei [35] vergleichbare Intensitäten auf, ähnlich dem Fragment (23 % rel. Int.), das in analoger Weise aus Verbindung [24] entsteht. Die Monoesterstruktur der Verbindungen [35] und [36] ist damit aus den massenspektrometrischen Daten gesichert. Das Vorliegen einer freien Hydroxygruppe erklärt dann auch das große Retentionsvolumen dieser Verbindung bei HPLC (Abb. 12). Die Stellung dieser Hydroxygruppe am C-11 wie in [37a], Schema 2, ist aus den auf S. 63 genannten Gründen unwahrscheinlich.

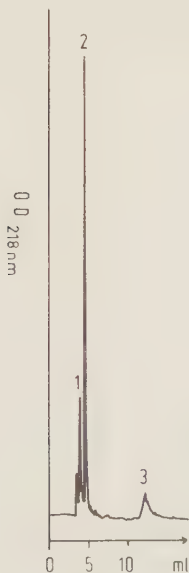


Abb. 12: Flüssigchromatogramm der Produkte aus der direkten Umsetzung von JH-III mit HFBA. Trennung mit polarem Eluens (Säule III b, s.S. 15). 1 und 2 wie in Abb. 10 und 11, 3 = 11-HFB-10-OH-JH-III [36]. Flußrate 2,2 ml/min, UV-Detektor 218 ± 10 nm.

Abb. 13 zeigt den Anteil einer Verbindung [34a] (Peak 2a) am Produktgemisch einer mit optimaler Ausbeute für [34] (Peak 2, ca. 80 %) verlaufenen Reaktion. Die Verbindung [34a] besitzt ein identisches Massenspektrum wie [34] und wird sowohl aus JH-I als aus JH-III gebildet.

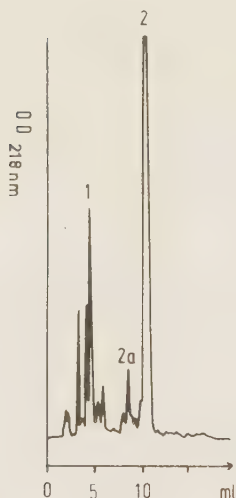


Abb. 13: Flüssigchromatogramm der Reaktionsprodukte von JH-III mit HFBA, in dem der Anteil einer Verbindung ([34a], Peak 2a) am Produktgemisch und das Intensitätsverhältnis von [34a] zu [34] (Peak 2) ersichtlich ist. Peak 1 und 2 wie in Abb. 10-12, Peak 2a = Isomeres zu Verbindung [34]. HPLC-Bedingungen: Säule I a (S. 15), Durchfluß 1,7 ml/min, UV-Detektor 218 $\pm$ 10 nm.

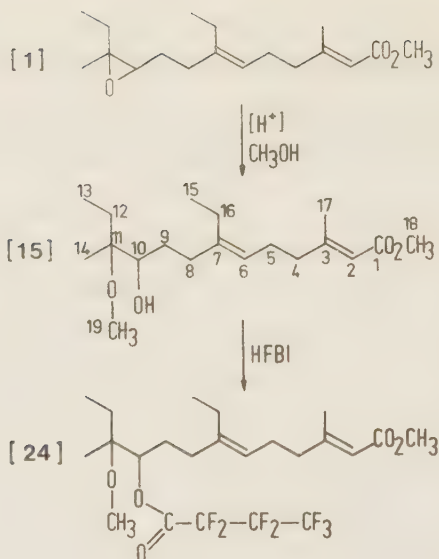
Es kann sich bei diesen Produkten um optische Isomere handeln, denn alle JH-Derivate besitzen am C-10 ein chirales Zentrum. Es ist aber unwahrscheinlich, daß es ähnliche Isomerenpaare sind wie bei den JH-NFH-Addukten (vgl. S. 72), da hier der mengenmäßige Anteil von [34a] zu [34] sehr klein ist und bei jenen die Isomeren nur von JH-I und JH-II mit zusätzlichem chiralen C-11 nachweisbar sind. Für die Derivatisierung biologischer Proben kam

dieser Weg aber nicht in Frage, weil die Ausbeuten auch bei gleichen Reaktionsbedingungen nicht reproduziert werden konnten.

3.2.2 Umsetzung von Juvenilhormonen zu 10-HFB-11-methoxy-Derivaten

Peter et al.³⁷ und Schooley et al.⁵⁷, die bei der Darstellung des JH-Diols im Submikrogrammbereich ebenfalls gescheitert waren, hatten an Stelle von Wasser Methanol addiert^{32,44}, wobei das Methanol zugleich Lösungsmittel war. Bei dieser Reaktion verläuft die Addition auch mit wenigen Nanogramm JH noch eindeutig zum 10-Hydroxy-11-methoxy-JH. Allerdings darf das perchlorsäurehaltige Methanol nicht länger als ca. 4 Wochen verwendet werden. Danach kann die Additionsreaktion stark verzögert ablaufen oder es werden andere Produkte gebildet. Für die weitere Derivatisierung des Methoxyhydrins zu einer mit dem ECD hochempfindlich nachweisbaren Verbindung verwendeten Bergot et al.³² Pentafluorphenoxyacetylchlorid als Elektrophor, Peter et al.⁴⁴ Dichlorbenzoylchlorid. Da ersteres nicht zugänglich war, wurden Derivatisierungen mit Dichlorbenzoylchlorid durchgeführt. Im mg-Maßstab verliefen sie mit ca. 85 % Ausbeute und waren mit denen der Erstautoren vergleichbar. Probleme traten insbesondere während der Gaschromatographie auf (vgl. S. 78). Deshalb wurde N-Heptafluorbutyrylimidazol (HFBI) zur Veresterung der noch freien OH-Gruppe bevorzugt.

Die Umwandlung eines Juvenilhormons zum 10-Heptafluorbutyryloxy-11-methoxy-JH ist im Schema 3 am Beispiel des JH-I dargestellt.



Schema 3

Beide Reaktionen verlaufen nahezu eindeutig zu den angegebenen Produkten (Ausbeute jeweils um 80 %). In Extrakten biologischen Ursprungs sind die Ausbeuten, besonders des zweiten Schrittes, schlechter und schwanken beträchtlich. Die Veresterung der Hydroxygruppe mit HFBI hat gegenüber der Verwendung der Säureanhydride und -chloride einige Vorteile. Bei der Umsetzung wird nur Imidazol freigesetzt. Die Zugabe einer Base in den Reaktionsansatz zum Abfangen gebildeter freier Säuren ist deshalb überflüssig. Die Umsetzung läßt sich mit kleinem Reagenzvolumen durchführen und das Beseitigen überschüssiger Reaktionsteilnehmer nach der Reaktion vereinfacht sich. Mit in Spuren vorhandenem Wasser wird Acylimi-

dazoliumsalz gebildet, das die Reaktion nicht beeinträchtigt. Die Nachreinigung des HFBI durch Destillation kann man sich deshalb ersparen. Bei der Extraktion der JH-HFB-Ester mit Ether aus dem Reaktionsansatz, der nach dem Abblasen eines Teils des HFBI im wesentlichen aus Acylimidazoliumsalz besteht, wird fast kein aus dem Reagenz stammendes Material auf die Dünnschichtplatte übertragen. Solches konnte nach der Umsetzung der JH-Methoxyhydrine mit 2,4-Dichlorbenzoylchlorid die DC-Reinigung stark beeinträchtigen. Die im Schema 3 gezeigte Reaktionsfolge erhöht im ersten Schritt die Polarität der Produkte gegenüber der Ausgangsverbindung, im zweiten wird sie dagegen etwas verringert. Diese Veränderungen werden bei der Auftrennung biologischer Proben ausgenutzt. Schon bei der Dünnschichtchromatographie im System A ist der R_f -Wert von JH-I nach der Methanoladdition geringer als der des nativen JH-III (Tab. 11).

Tabelle 11: R_f -Wert der Juvenilhormone und ihrer 10-Hydroxy-11-methoxy- und 10-HFB-11-methoxy-Derivate und der Verbindung [4].
DC: Kieselgel 60 F₂₅₄, Laufmittel n-Hexan/Ethylacetat (65:35).

	Hormon	10-OH-11-OCH ₃	10-HFB-11-OCH ₃
JH-I	0,51	0,31	0,58
JH-II	0,49	0,30	0,55
JH-III	0,47	0,27	0,51
JH-III-Et	0,49	0,28	-

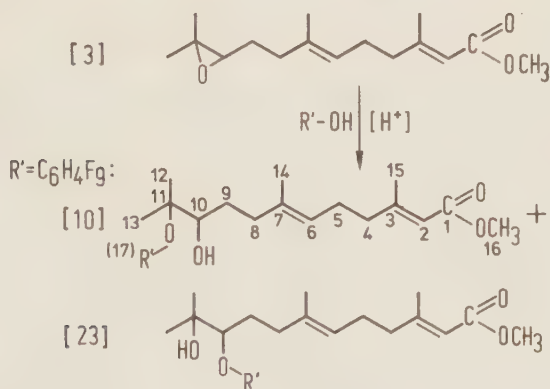
Das ermöglicht es, nach jeder Reaktion die nicht veränderten Begleitsubstanzen sowohl dünn-schichtchromatographisch als auch mit HPLC zu entfernen. Bei der Dünnschichtchromatographie (DC) der JH-HFB-Ester werden außerdem die löslichen Anteile abgetrennt, die aus der Umsetzung der JH-Methoxyhydrine mit HFBI stammen. Für die Juvenilhormone und ihre HFB-Ester ist Dibutylphthalat bei beiden Methoden ein gut geeigneter externer Standard. In der DC ist sein R_f -Wert zuerst mit dem des JH-I, dann mit dem des JH-III-HFB vergleichbar.

3.2.3 Reaktion der Juvenilhormone mit fluorierten Alkoholen

Die im vorhergehenden Kapitel beschriebene Addition von Methanol an Juvenilhormone sollte auch mit höheren Alkoholen möglich sein. Die perchlorsäurekatalysierte Addition von Ethanol und Octanol verläuft im Mikromaßstab glatt mit Ausbeuten von über 80 %. Die Addition eines halogenierten Alkohols könnte in einer einstufigen Reaktion für einen hochempfindlichen Nachweis mit dem ECD geeignete Juvenilhormonderivate liefern. Bei anschließender Veresterung der freien OH-Gruppe mit Substanzen, die die Empfindlichkeit der ECD-Messung erhöhen, ließe sich die Nachweisgrenze für JH weiter senken. Darüberhinaus hatten die Massenspektren der 11-Alkoxy-10-hydroxy-Juvenilhormonderivate gezeigt, daß die Fragmentierung dieser Verbindungen wesentlich anders verläuft als bei den Juvenilhormonen. Basepeak im Spektrum dieser Verbindungen ist, nach Spaltung zwischen C-10 und C-11, das Fragment mit C-11 (vgl. Schema 5, S. 92). Seine Massenzahl m/e wird wesentlich be-

stimmt durch das Molekulargewicht des addierten Alkohols.

Die Addition des (1H,1H,2H,2H)-Perfluorhexanols (Nonafluorhexanol, NFH-OH) an ein Juvenilhormon verläuft im Prinzip wie beim Methanol und ist im Schema 4 am Beispiel des JH-III dargestellt:



Schema 4

Neben den Verbindungen [10] und [23] entsteht eine Reihe von Umlagerungsprodukten mit unbekannter Struktur und etwas JH-Diol (Verbindung [5]). Befriedigende Ausbeuten erhält man allerdings nur in dem sehr engen Konzentrationsbereich von 0,03 % bis 0,06 % Perchlorsäure in NFH-OH. Übersteigt die Säurekonzentration 0,06 %, verschiebt sich das Produktverhältnis zugunsten der Umlagerungsprodukte (Abb. 14, Peakgruppe 1). Bei geringerer Konzentration als 0,03 % ist die Reaktion unvollständig. Weder Verlängerung der Reaktionszeit (bis zu 2 Tagen) noch Erhöhung der Reaktionstemperatur (60 ° für 2 Stunden) führen zu einer Änderung der nach wenigen Minuten beobachtbaren Umsatzrate. Das gleiche ist aber

auch der Fall, wenn man viel JH (z.B. 2 mg JH-III = 7,5 μmol) mit verhältnismäßig wenig (50 μl = 300 μmol) NFH-OH/0,03 % HClO_4 umsetzt. Nicht umgesetztes JH reagiert dann erst nach Zugabe von weiterem perchlorsäurehaltigem NFH-OH oder weiterer 70%iger Perchlorsäure.

Diese Ergebnisse lassen sich mit einer nur katalytischen Funktion der Perchlorsäure nicht erklären. Genausowenig die Tatsache, daß JH mit 0,01 % HClO_4 in NFH-OH nicht reagiert. Optimale Ausbeuten an Verbindung [10] (Schema 4) und den entsprechenden JH-I und -II-Derivaten [18] und [22] erhält man (30 - 40 % nach DC und HPLC-Reinigung), wenn man JH (ng bis einige μg) in wenig NFH-OH (7 bis 50 μl) löst und dann mit gleichem Volumen perchlorsäurehaltigem (0,06 %) NFH-OH vermischt. Nach 5 Minuten ist im Reaktionsansatz gaschromatographisch kein JH mehr nachweisbar. Der Verbindung [23] bzw. ihren JH-I- und JH-II-Homologen entsprechende Substanzen (10-Alkoxy-11-Hydroxy-JH) sind nach der Methanol- oder Ethanoladdition ($\text{R}' = \text{CH}_3$ bzw. C_2H_5) an alle drei Juvenilhormone nicht nachweisbar, nach der Nonafluorhexanoladdition ($\text{R}' = \text{C}_6\text{H}_4\text{F}_9$) an JH-I und -II ebenfalls nicht. Nur bei der Reaktion mit JH-III entsteht [23] mit ca. 20 % von [10] (Vergleich der UV-Absorption bei 218 nm). Andererseits zeigt das Flüssigchromatogramm der Umsetzungsprodukte von JH-I (Abb. 14) und JH-II einen weiteren Peak (Peak 3 in Abb. 14), dessen Massenspektrum mit dem der Verbindung [10] entsprechenden JH-I- bzw. JH-II-Derivat ([18], [22], Peak 2) identisch ist. Da beide Verbindungen zusätzlich zum C-10 auch am C-11 ein Asymmetriezentrum besitzen, kann man davon ausgehen, daß

es sich um zwei optische Isomere handelt. Dafür spricht auch ein Peakflächenverhältnis von 6:1. Bei der Synthese von JH-I und JH-II wird das all-trans Isomere zu ca. 16 % gebildet^{46,59,60,61} und dann nicht mehr abgetrennt (vgl. Abb. 5). Die zum Peak 3 (Abb. 14) gehörende Substanz könnte also aus diesem Isomeren gebildet worden sein.

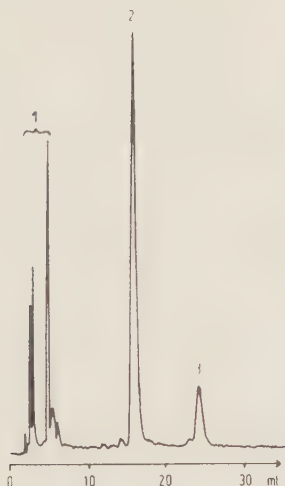


Abb. 14: Flüssigchromatogramm der Reaktionsprodukte nach Umsetzung von JH-I mit NFH-OH/0,03 % HClO₄. Nach dünnschichtchromatographischer Trennung des Reaktionsansatzes waren aus dem Kieselgel alle Substanzen mit größerem R_F-Wert als NFH-OH extrahiert worden. Um die Produktverhältnisse abschätzen zu können, wurde von diesem Extrakt das Chromatogramm aufgenommen. Es zeigt neben Umlagerungsprodukten (Peakgruppe 1) zwei Signale (2 u. 3), die identische Massenspektren liefern. Ebenfalls gebildetes JH-I-Diol läßt sich mit den gewählten Chromatographiebedingungen (Säule I c, vgl. S. 15) nicht als Peak erkennen.

Die NMR-Daten beider Verbindungen zeigen geringe Unterschiede in der chemischen Verschiebung δ der Protonen H-13 und H-14 (vgl. Schema 3, S. 68, Zuordnung nach Kuhn und Rembold⁶²). Nach Zugabe von Tris[3-(2,2,2-trifluor-1-hydroxyethyliden)-d-camphorato]-europium (Shiftreagenz Eu(TFC)₃), das mit den Isomeren unterschiedlich

starke Komplexe bildet, werden tatsächlich bei beiden isomeren JH-Derivaten die Signale unterschiedlich verschoben: δ 1,09 (H-14, s) bei JH-I-NFH-1 bzw. 1,14 bei JH-I-NFH-2 nach 1,26/1,27. Eine Aussage darüber, ob der Komplex mit dem Shift-Reagenz am Assymmetriezentrum C-10 oder C-11 gebildet wird, ist aus diesen Daten nicht möglich.

Die Struktur des JH-Nonafluorhexanoladdukts als 10-Hydroxy-11-NFH-JH wird durch folgende Befunde gestützt: Untersuchungen über die säurekatalysierte Ringöffnung von unsymmetrisch alkylsubstituierten Epoxiden führten allgemein zu dem Ergebnis, daß die Bindungsöffnung im Dreiring zwischen Sauerstoff und dem C-Atom erfolgt, das höher alkylsubstituiert ist (neuere Übersicht von R.A. Wohl⁶³). Das sollte im Falle der Juvenilhormone zu 10-Hydroxy-11-Alkoxy-Derivaten führen. Die Massenspektren bestätigen diese Erwartung (unter den Bedingungen der Elektronenstoßionisation sollte das Molekül zwischen C-10 und C-11 fragmentieren⁶⁴): Die Summe aus Basepeak a (vgl. Schema 5, S. 92) und dem intensiven Fragment b entspricht dem Molekulargewicht des jeweiligen JH-Alkanoladdukts. Dabei entspricht das Fragment mit m/e 225 (bei JH-III und -II) und m/e 239 (bei JH-I) mit seinen Folgeprodukten, insbesondere Fragment c, dem Spektrum des JH-Diols, in dem mit Sicherheit eine OH-Gruppe am C-10 vorhanden ist.

In beiden Fragmenten variiert m/e in Abhängigkeit von den untersuchten Juvenilhormonen: In Fragment a erhöht sich m/e um 14, entsprechend dem verlängerten Alkylrest am C-11, bei den JH-I- und JH-II-Derivaten gegenüber dem gleichen JH-III-Derivat, in Fragment b wieder um 14 Masseneinheiten bei JH-I gegenüber JH-II und

JH-III. Die Art des addierten R-OH beeinflusst die Fragmente b und c nicht, wohl aber a: Beim JH-III-Diol ($R=H$) ist m/e 59, beim Methoxyhydrin ($R=CH_3$) 73; addiert man Deuteromethanol an JH-III, wird m/e für a 76, mit Ethanol 87, Octanol 171, Nonafluorhexanol 305. Beim Nonafluorhexanoladdukt des JH-III entsteht das Stellungsisomere [23] in Schema 4 (s.S. 71) in merklichen Anteilen. Sein Massenspektrum unterscheidet sich deutlich vom normalen Addukt: Es fehlt das Molekülion und stattdessen beobachtet man mit geringer Intensität M^+-18 . Beides ist auch in allen untersuchten JH-Derivaten mit Hydroxygruppe am C-11 der Fall (vgl. Dunham et al.⁵⁸). Der intensive Peak mit m/e 317 ist erklärbar durch Fragmentierung zwischen C-9 und C-10 und Verlust von H_2O . Die für Fragment b und Folgeprodukte typischen Fragmente fehlen in dieser Verbindung. Zusätzlich gestützt wird die Struktur von Verbindung [23] auch durch das gegenüber 10-OH-11-NFH-JH-III geringere Retentionsvolumen bei der Adsorptionschromatographie, das einer verringerten Polarität durch stärkere Abschirmung der OH-Gruppe am C-11 entspricht.

Die NMR-Spektren ermöglichen keine Aussage über den Ort der Addition von NFH-OH an JH. Ein Unterschied in der chemischen Verschiebung δ dürfte sowohl für das OH-Proton als für die Alkoxyprotonen nahezu unabhängig davon sein, ob der jeweilige Rest an C-10 oder C-11 gebunden ist (vgl. NMR-Daten von JH-Diol). Da auch Kopplungen zum C-10-H von keinem Rest O-R vorliegen, ist mit H-NMR-Spektren keine Aussage über die Stellungsisomeren möglich.

3.3 Gaschromatographische Bestimmung derivatisierter Juvenilhormone und Nachweis mit dem ECD

Soweit mit Hilfe der Gaschromatographie Informationen über die Reinheit von Verbindungen sowie den Verlauf und die Geschwindigkeit von Derivatisierungsreaktionen gewonnen werden sollten, wurde zum Substanznachweis der FID benutzt, da dabei genügend Material ($>10 \mu\text{g}$) für die Messungen zur Verfügung stand. Ergebnisse und Chromatogramme sind bei den Umsetzungen mit Juvenilhormonen (S. 59 ff.) beschrieben.

Wichtiger war die Gaschromatographie für die mikroanalytische Bestimmung der Juvenilhormonkonzentration in biologischen Proben. Mit dem ECD läßt sich nach Derivatisierung die nötige Empfindlichkeit ($\geq 5 \text{ pg/Injektion}$) erreichen. Im Gegensatz zum FID, dessen Signalintensität der Kohlenstoffmenge im eluierten Gasstrom annähernd proportional ist, weist der ECD selektiv solche Verbindungen nach, die leicht durch Aufnahme thermischer Elektronen ionisiert werden. Solche Substanzen sind insbesondere elektronenarme Aromaten, sauerstoffreiche oder halogenierte Verbindungen. Zusätzlich wird die Nachweisempfindlichkeit durch das Trägergas beeinflusst. Die Eichkurven in Abb. 16 zeigen die Zunahme der Werte für die Peakflächen (in $\mu\text{V} \cdot \text{s}$) mit Stickstoff als Trägergas (—○—) anstelle von Argon/Methan (—●—). Die Erhöhung der Empfindlichkeit wird zum Teil durch verstärktes Rauschen des Grundstroms zunichte gemacht.

3.3.1 Nachweis der Dichlorbenzoate

In den zuerst von Peter et al.⁴⁴ beschriebenen Dichlorbenzoaten liegen JH-Derivate vor, in denen Aromatizität und Elektronegativität der Halogene zugleich optimal für den empfindlichen Nachweis genutzt werden können. Die gaschromatographische Trennung reiner JH-III- und JH-I-Dichlorbenzoate bereitet keine Schwierigkeiten (Abb. 15A).

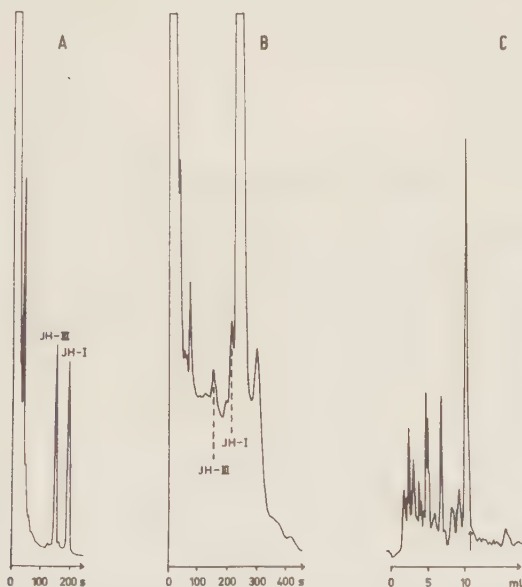


Abb. 15: Chromatogramme der (2,4-Dichlorbenzoyloxy)-JH-Derivate (JH-DCB). A: Gaschromatographische Trennung von reinem JH-I- und JH-III-DCB über eine 2 m x 2 mm Säule (3 % OV 17). Ofen 300, Einspritzblock 250, ECD 350 °C. Trägergas Argon/10 % Methan, 20 ml/min. B: Gaschromatogramm eines biologischen Extrakts nach HPLC-Reinigung (vgl. C). Säule wie in A, Ofen 280, Einspritzblock 250, ECD 350 °C. Trägergas Argon/10 % Methan, 30 ml/min. Injiziert wurden 0,7 % des Gesamtextrakts. Das intensive Signal bei 230 Sekunden stammt aus der Substanz, die im Flüssigchromatogramm (C) dem intensivsten Peak entspricht. C: Flüssigchromatogramm einer biologischen Probe nach Umsetzung mit 2,4-Dichlorbenzoylchlorid. Säule I c (s.S. 15), Flußrate 1,6 ml/min. Der Pfeil markiert das Retentionsvolumen des JH-III-DCB (vgl. Abb. 6). Das Eluat zwischen $V_R = 5,4$ und 12,6 ml liefert das Chromatogramm in B.

Nachteilig für die Stabilität und Empfindlichkeit des ECD ist die hohe Arbeitstemperatur ($>270^{\circ}\text{C}$), bei der diese JH-Derivate erst eluiert werden. Das bedingt verstärktes Säulenbluten und infolgedessen rascheres Verschmutzen des Detektors. Bei der Messung von derivatisierten Extrakten aus Honigbienen wurde häufig eine Substanz in unmittelbarer Nachbarschaft des JH-I-Derivats mit so intensivem Signal nachgewiesen (Abb. 15B), daß die Peakfläche von JH-I-DCB kaum noch bestimmbar war. Flüssigchromatographisch ließ sich die Verunreinigung nicht von den JH-Dichlorbenzoaten abtrennen (Abb. 15C).

3.3.2 Juvenilhormontiterbestimmungen mit Hilfe der Heptafluorbutyrate

Die Nachweisempfindlichkeit der 10-Heptafluorbutyryloxy-11-methoxy-Juvenilhormone ist mit der der JH-Dichlorbenzoate vergleichbar (Abb. 16,17).

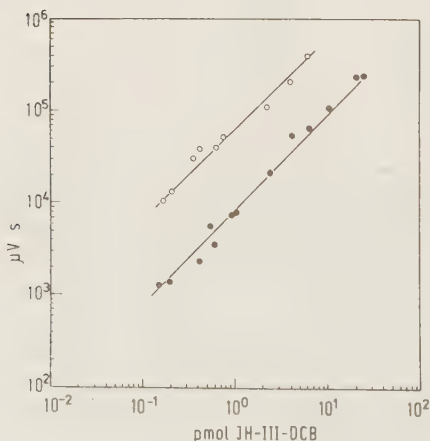


Abb. 16: Empfindlichkeit des Elektroneneinfangdetektors (ECD) in Abhängigkeit vom Trägergas. Eichkurven des JH-III-DCB bei Verwendung von Stickstoff (—○—) und Argon/5 % Methan (—●—) als Trägergas. Stationäre Phase SE 30.

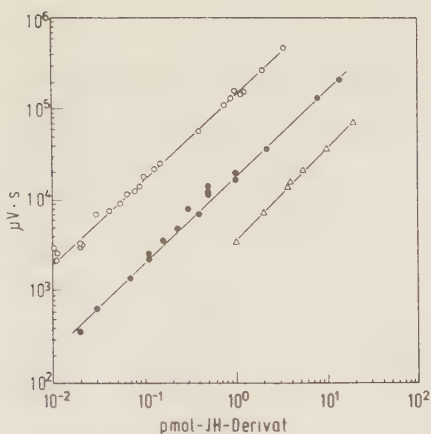


Abb. 17: Eichkurven von JH-HFB- (○, ●) und JH-NFH-Derivaten (Δ). Trägergas N₂, stationäre Phase SE 30.
 —○— : Maximal erreichte Empfindlichkeit für JH-III-HFB mit einem neuen Detektor.
 —●— : Durchschnittliche Empfindlichkeit des gleichen Detektors, wie sie sich nach wenigen Tagen einstellt.
 —△— : Empfindlichkeit des ECD für das JH-III-NFH-Derivat.

Abbildung 17 zeigt zwei Eichkurven für die JH-III-HFB-Derivate (—○— und —●—). Die obere wurde bei maximaler Empfindlichkeit eines neuen ECD aufgenommen; die untere entspricht der durchschnittlichen Empfindlichkeit nach nur kurzem Betrieb des ECD. Im Gegensatz zu den JH-Dichlorbenzoaten lassen sich die Heptafluorbutyrate bei weitaus niedrigerer Arbeitstemperatur (um 200 °C) trennen (Abb. 18A, 21A). Weil aber die immer vorhandenen Weichmacher, insbesondere Phthalsäureester, bei dieser Ofentemperatur auf den gewählten Säulen später als die Juvenilhormon-HFB-Derivate eluiert werden, sind bei biologischen Proben (Abb. 18B) längere Analysenzeiten erforderlich. Abb. 18A zeigt die Trennung der drei JH-HFB-Derivate auf einer Säule mit 3 % OV 1 als stationärer Phase und Argon/10 % Methan als mobiler Phase. Ein Vergleich mit Abb. 21A zeigt, wie sich die relativen Retentionszeiten der JH-Derivate bei Verwendung einer anderen stationären Phase (OV 225) ändern. Ein Wechsel der mobilen Phase hat dagegen keinen spürbaren

Einfluß. Der JH-III-HFB-Peak in Abb. 18A entspricht einer Menge von 1,07 pmol bei einer Elektrometerabschwächung von 128. In Abb. 18B - D sind Chromatogramme biologischer Proben wiedergegeben. Bei der Reinigung der HFB-Derivate mit HPLC war das Eluat mit allen JH-Derivaten gesammelt, eingengt und in 50 µl (18B), 55 µl (18C) und 75 µl (18D) n-Hexan aufgenommen worden.

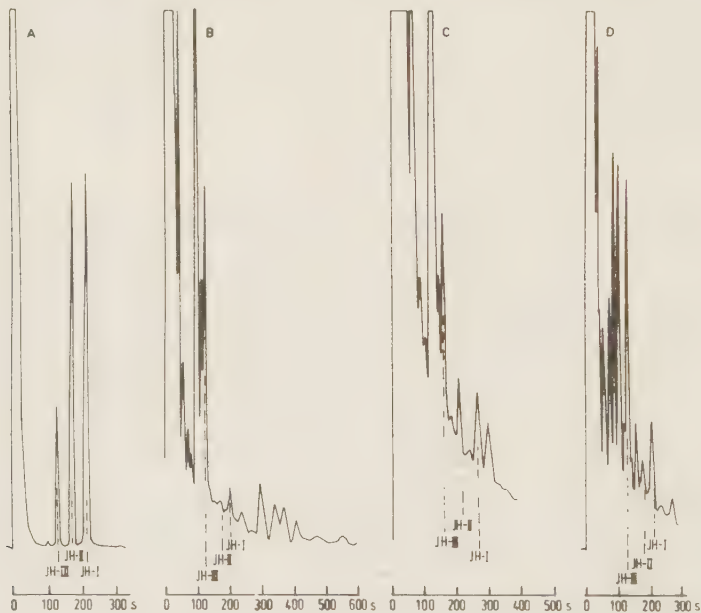


Abb. 18: Gaschromatogramme der 10-Heptafluorbutyryloxy-11-methoxy-JH-Derivate (JH-HFB). A: Trennung der synthetischen JH-HFB-Ester. Das JH-III-Signal entspricht 1,07 pmol. Elektrometerabschwächung 128. B: Chromatogramm eines Extrakts von L5-Arbeiterinnenlarven der Honigbiene. Der JH-III-Peak entspricht 0,78, der JH-I-Peak 0,010 pmol, Abschwächung 64. C: Entsprechendes Chromatogramm für junge Arbeiterinnenpuppen (Pw). Der JH-III-Peak entspricht 0,05, der JH-I-Peak 0,027 pmol, Abschwächung 16. D: Chromatogramm des Extrakts von Ammenbienen. In der injizierten Lösung (0,9 µl von 75 µl Gesamtlösung) werden 0,78 pmol JH-III nachgewiesen, Abschwächung 64. GC-Bedingungen: Säule 2 m x 2 mm i.D. mit 3 % OV 1 auf Gaschrom Q. Einspritzblock 200, ECD 300 °C. Bei A, B und D war Argon/10 % Methan Trägergas (28 ml/min), Ofentemperatur 200 °C. Beim Chromatogramm C lag die Ofentemperatur bei 195 °C, Gasfluß 28 ml N₂/min.

Bei ECD-Messung lassen sich nach den in Abbildung 18 gezeigten Ergebnissen alle drei JH-Derivate in einem Lauf bestimmen. Man erkennt, daß der JH-III-HFB-Ester in allen Proben nachzuweisen ist, das JH-II-Derivat dagegen nur sehr wenig oder überhaupt nicht. Die aus den JH-I-Signalen errechnete Hormonmenge entspricht der des zugesetzten tritiummarkierten Hormons.

Bei dieser Nachweismethode werden ca. 5 ml HPLC-Eluat konzentriert und mit einem weiteren ml n-Hexan in ein 100 µl-Schliffröhrchen übertragen. Eventuell im n-Hexan vorhandene Verunreinigungen sind, wenn die Probe dann in 50 µl dieses Lösungsmittels aufgenommen wird, mehr als 100-fach angereichert. Abb. 19A zeigt das Chromatogramm konzentrierten n-Hexans, wie es für die in Abb. 18 dargestellten Messungen verwendet wurde. (Die mit S bezeichneten Signale stammen aus dem Injektionsseptum). Der unterschiedliche Anteil der Verunreinigungen in n-Hexan-Lieferungen mit p.a. Qualität wird beim Vergleich von Abb. 19A und B deutlich. Hier wird eine im n-Hexan vorkommende Substanz mit einer dem JH-III-HFB-Derivat so ähnlichen Retentionszeit (Pfeil) eluiert, daß ihr Signal den JH-III-HFB-Peak bei geringer Konzentration völlig überlagert. Sämtliche vom gleichen Hersteller bezogenen n-Hexan-Qualitäten, auch das "zur Rückstandsanalyse", weisen ein der Abb. 19B gleiches Chromatogramm auf. Das Chromatogramm 19D zeigt, bei vierfach unempfindlicherem Detektor, die 'Reinheit' einer weiteren n-Hexan-Probe mit p.a. Qualität. Das Chromatogramm C stammt von dem besten schließlich noch verfügbaren n-Hexan. Wohl ist damit eine Auflösung der Signale des JH-III-HFB-Esters von denen

der Verunreinigungen möglich, aber deren hohe Intensität bedingt eine Verschlechterung bei der quantitativen Bestimmung, verglichen mit dem n-Hexan der Abb. 19A.

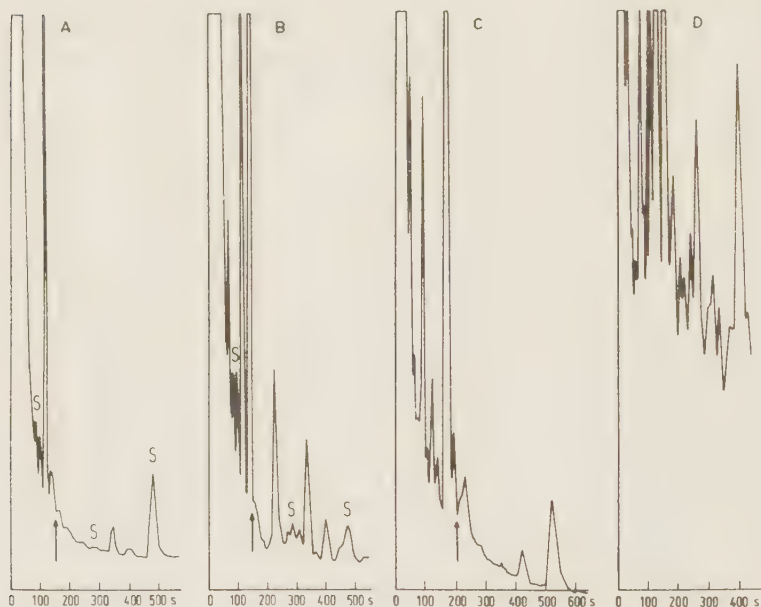


Abb. 19: Gaschromatogramme konzentrierten n-Hexans (1:120).
A: n-Hexan p.a., beste Lieferung. B: n-Hexan p.a., unmittelbar links neben dem Pfeil (Retentionszeit des JH-III-HFB) ist gegenüber dem Chromatogramm A ein intensives Signal hinzugekommen, das in geringer Menge vorhandenes JH-III-HFB überlagern würde.
C: n-Hexan "nanograde" (vergleichbar "Resi Analysed"). D: n-Hexan p.a.
GC-Bedingungen: Einspritzblock 250, ECD 300 °C. A und B: Ofen 200 °C, 32 ml N₂/min, Abschwächung 16. C: Ofen 190 °C, 28 ml N₂/min, Abschwächung 16. D: Ofen 195 °C, 30 ml N₂/min, Abschwächung 32.

Durch Sammeln des HPLC-Eluats in einzelnen Fraktionen (Abb. 20) und deren getrennter Messung mit dem GC-ECD-System läßt sich das

Konzentrieren der n-Hexan-Verunreinigungen umgehen. Da für jedes Hormon jetzt mindestens je eine, maximal drei Fraktionen gaschromatographisch untersucht werden müssen, vervielfacht sich die Zahl der Messungen für jede biologische Probe.



Abb. 20: Flüssigchromatogramm einer biologischen Probe nach ihrer Derivatisierung mit HFBI. Säule I b (vgl. S. 15). Flußrate 1,6 ml/min, UV-Detektor 218 ± 10 nm. 2 = bis(2-Ethylhexyl)-phthalat, 5 = Dibutylphthalat (vgl. Abb. 8). Fraktionen siehe Abb. 21.

In Abb. 21 sind Chromatogramme der die JH-Derivate enthaltenden Fraktionen aus der HPLC-Reinigung (Abb. 20) einer biologischen Probe dargestellt. Aufgrund der Radioaktivitätsmessungen konnte festgestellt werden, daß das tritiierte JH-I-Derivat in der HPLC-Fraktion 4, in Spuren auch in 3 und 5, enthalten ist. Das Gaschromatogramm dieser Fraktion ist in Abb. 21B gezeigt.

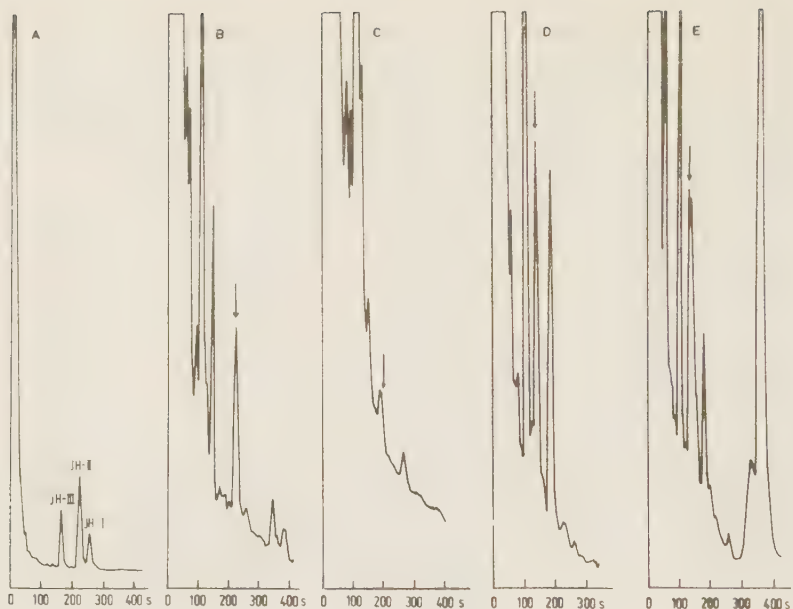


Abb. 21: Gaschromatogramme der JH-HFB-Ester (A) und von HPLC-Fraktionen (vgl. Abb. 20) einer biologischen Probe (B - E). Der Pfeil markiert die Retentionszeit des jeweiligen JH-Derivats. B: Fraktion 4 der biologischen Probe. In dieser Fraktion wird JH-I eluiert. Der GC-Peak mit dessen Retentionszeit entspricht 0,038 pmol. C: Fraktion 6, die JH-II-HFB enthalten sollte. D: Fraktion 10 mit der Hauptmenge des JH-III-Derivats. E: Fraktion 11, in der eine Begleitsubstanz unmittelbar nach dem JH-III-HFB eluiert wird. Säule: 2 m x 2 mm i.D., bei A mit 3 % OV 225 auf Gaschrom Q, Ofentemperatur 200, Einspritzblock 200, ECD 300 °C. 28 ml N₂/min, Abschwächung 512. B - E: 3 % SE 30 auf Gaschrom Q, Ofen 195, Injektor 200, Detektor 300 °C, 23 ml N₂/min, Elektrometerabschwächung 16.

Mit einer Retentionszeit von 226 Sekunden wird eine Substanz eluiert, die 0,038 pmol JH-I entspricht. Mehr als die Hälfte dieser Hormonmenge (54 %) stammt von dem anfangs zugesetzten, radioaktiven JH-I. Der Rest kann biologischen Ursprungs sein. Jedoch

wurde bei Chromatographie über andere Säulen in der gleichen Lösung weniger JH-I nachgewiesen (minimal 0,022 pmol). Diese Menge liegt nur noch um 8 % über der des für die Ausbeutebestimmung zugesetzten JH-I. Da andererseits in anderen Proben mit dem ECD auch weniger JH-I (bis 18 %) gefunden wurde, als aufgrund der Radioaktivitätsbestimmung zu erwarten war, wird ein möglicher Fehler von ca. 20 % für alle errechneten Werte zugrunde gelegt. In den Fraktionen 3 und 5 hat kein Peak die Retentionszeit des JH-I-HFB-Esters. Nach seinem Retentionsvolumen wäre das JH-II-Derivat in Fraktion 6 des Flüssigchromatogramms (Abb. 20) zu erwarten. Ein Gaschromatogramm dieser Fraktion zeigt Abb. 21C. Das zweite Maximum des unter dem Pfeil erkennbaren Doppelpeaks hat mit 184 Sekunden eine um 4 s kürzere Retentionszeit als der JH-II-HFB-Ester. Da die Retentionszeit um maximal ± 2 Sekunden vom Mittelwert abweicht, ist das Vorhandensein von JH-II in dieser Probe unwahrscheinlich. Messungen auf anderen Säulen zeigen, daß JH-II nicht in meßbaren Konzentrationen vorkommt.

Im Chromatogramm der Fraktion 10 (Abb. 21D) entspricht der Peak mit 137 Sekunden Retentionszeit 0,055 pmol JH-III-HFB. Nur wenige Sekunden (6 s) nach dem JH-III-Derivat wird in Fraktion 11 (Abb. 21E) eine Verunreinigung eluiert. Die noch ausreichende Auflösung der Peakmaxima erlaubt es, den JH-III-Anteil dieses Doppelpeaks mit 0,034 pmol zu bestimmen. In den Fraktionen 9 und 12 wird kein weiteres JH-III-Derivat gefunden. In den Chromatogrammen D und E erkennt man zusätzlich die Zu- und Abnahme der Peakintensitäten von Begleitsubstanzen. Beim Vereinigen aller Fraktionen, die JH-Derivate enthalten können, würden die Peaks sol-

cher Verunreinigungen möglicherweise mit denen von JH-HFB-Estern überlappen. Deshalb, und wegen der mangelhaften Reinheit der Lösungsmittel, wurde die überwiegende Zahl der JH-Titerbestimmungen mit GC-ECD nach Fraktionieren des HPLC-Eluats durchgeführt. Die ausgewählten Beispiele zeigen, daß der JH-Nachweis nach ihrer Derivatisierung mit HFBI auch in biologischem Material bis in den fmol-Bereich möglich ist. Gleichzeitig wird deutlich, daß trotz umfangreicher Vorreinigung der Proben noch immer Substanzen vorhanden sind, die vom JH-Derivat nicht abgetrennt werden und im selektiven Detektionssystem des ECD ein intensives Signal erzeugen. Erst die Trennung der Proben über verschiedene stationäre Phasen erlaubt es, JH-Mengen zu bestimmen, wobei der niedrigste gefundene Wert als der einzig realistische anzusehen ist. Die auf diese Weise für JH-I errechneten Mengen entsprechen in fast allen Fällen dem zur Ausbeutebestimmung zugesetzten ^3H -JH-I. Die gaschromatographisch gleiche Wiederfindungsrate wie für die Radioaktivität (max. $\pm 20\%$) bestätigt die Richtigkeit der Messung und die Anwendbarkeit der Methode.

3.3.3 Empfindlichkeitsbestimmung der NFH-Derivate

Da die Nonafluorhexanoladdukte mehr Halogen enthalten als die HFB-Ester der JH, konnte man eine vergleichbare Empfindlichkeit für den Nachweis im ECD erwarten. Die untere Eichkurve ($\text{---}\Delta\text{---}$) in Abb. 17 zeigt, daß gleiche Mengen dieses Derivats nur ca. 10 % der Signalintensität der HFB-Ester ergeben. Es ist denkbar⁶⁵, daß die Ether im ECD anders ionisiert werden als die Ester. Für die gaschromatographische Trennung der NFH-Derivate können als sta-

tionäre Phasen SE 30 (Abb. 22) oder OV 17 benutzt werden. Bei Chromatographie über OV 1 weisen die Peaks starkes Tailing auf. Von wesentlich größerem analytischem Wert sind die NFH-OH-Additionsprodukte der Juvenilhormone für den massenspektrometrischen Nachweis ausgewählter Fragmente.



Abb. 22: Gaschromatogramm der JH-NFH-Derivate; Nachweis mit dem ECD. Säule: 2 m x 2 mm i.D., 3 % SE 30 auf Gaschrom Q. Ofen: 210, ECD 300, Einspritzblock 200 °C, 25 ml N₂/min. 1 = JH-III-NFH, 2 = JH-II-NFH, 3 = JH-I-NFH.

3.4 Trennung von Juvenilhormon-NFH-Derivaten über Glaskapillarsäulen und massenspektrometrischer Nachweis juvenilhormonspezifischer Fragmente (SIM) im GC-Eluat

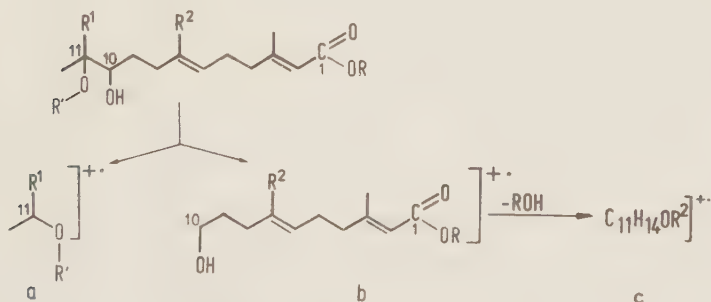
Die im vorhergehenden Kapitel (3.3) beschriebenen Resultate haben gezeigt, daß der gaschromatographische Nachweis von Juvenilhormonmengen im fmol-Bereich nach zweistufiger Derivatisierung möglich ist. Allerdings ist die Probenvorbereitung aufwendig und erfordert eine weitgehende Abtrennung der Juvenilhormone oder ihrer Derivate von Begleitsubstanzen. Aber auch dann ist immer noch damit zu rechnen, daß andere Verbindungen mit gleicher Retentionszeit wie die Juvenilhormon-Derivate eluiert und vom ECD nachgewiesen werden, die dann die Quantifizierung im untersten Empfindlichkeitsbereich unmöglich machen. Parallelmessungen über Säulen mit anderen stationären Phasen können diesen Nachteil nur in begrenztem Maße ausgleichen.

Die in einer einstufigen Reaktion darstellbaren Juvenilhormon-NFH-Addukte zeigen eine derart verringerte Nachweisbarkeit im ECD, daß sie für diese Art von Detektoren ungeeignet sind. Zusammen mit der etwa halb so großen Reaktionsausbeute wie bei den DCB- und HFB-Derivaten von Juvenilhormonen ergibt sich diesen gegenüber ein Empfindlichkeitsverlust auf weniger als ein Zehntel. Durch Veresterung der freien Hydroxygruppen ließe sich ein weiterer Elektrophor in das Molekül einführen und möglicherweise eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit erreichen. Dies wurde nicht versucht, da die oben genannten Probleme der GC-ECD-Messung dadurch nicht wesentlich verringert werden.

Dagegen zeigte die systematische Betrachtung der Massenspektren

der Juvenilhormon-Alkoxy-Addukte, daß die Empfindlichkeit des sehr substanzspezifischen Detektors Massenspektrometer beträchtlich gesteigert werden kann, wenn man damit das Vorkommen eines (Single Ion Detektion) oder mehrerer (Multiple Ion Selektion, MIS) ausgewählter intensiver Fragmente der Juvenilhormon-Derivate im GC-Eluat mißt.

Wie in Schema 4 (S. 71) gezeigt wurde, entstehen bei der säurekatalysierten Addition von Alkoholen an ein Juvenilhormon überwiegend die 11-Alkoxy-10-Hydroxy-Derivate. Die Massenspektren dieser Derivate (Abb. 23B, 24) zeigen beim Vergleich mit denen der Juvenilhormone (Abb. 23A, Beispiel JH-III) zwei intensive Fragmente (b und c) bei hohen Massenzahlen (m/e ca. 200) und einen Basepeak, dessen Fragmentmasse sich je nach Juvenilhormon-Homologem und addiertem Alkohol verändert. Die Fragmentierung verläuft dabei nach Schema 5.



Schema 5

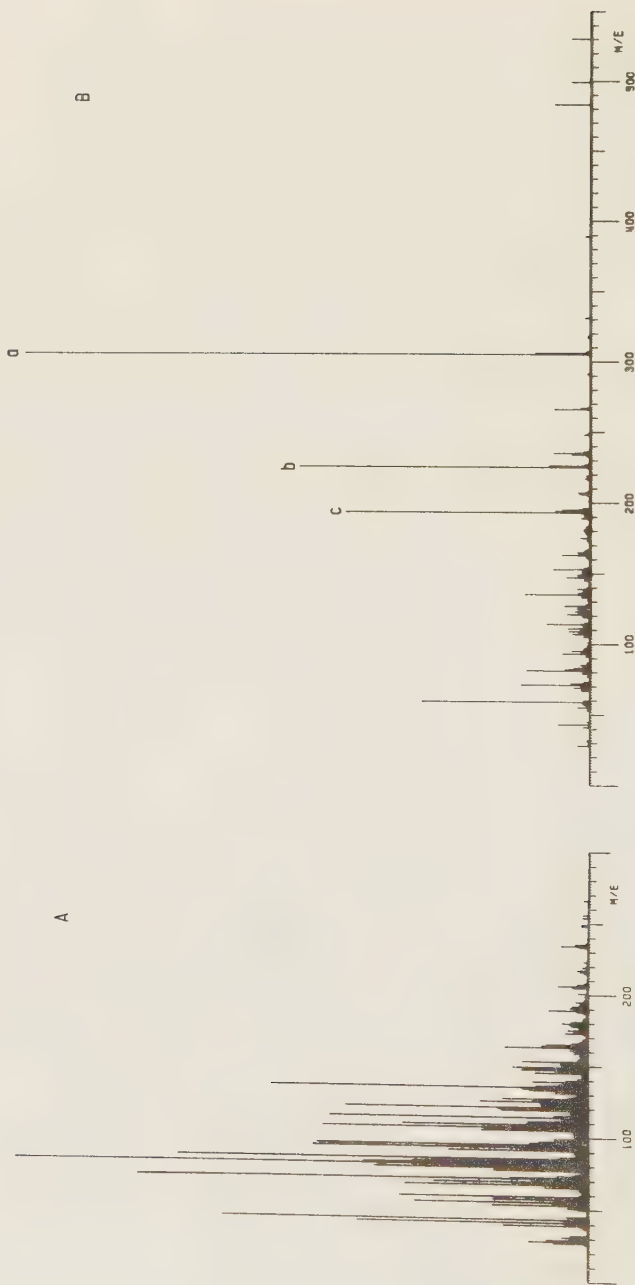


Abb. 23: Massenspektren von JH-III (A) und seinem Nonafluorhexanoladdukt (B) (Direktverdampfung, 70 eV, s.S. 11). Bei B ist die Signalintensität oberhalb m/e 400 10fach verstärkt.
a, b, c siehe Text und Tabelle 12.

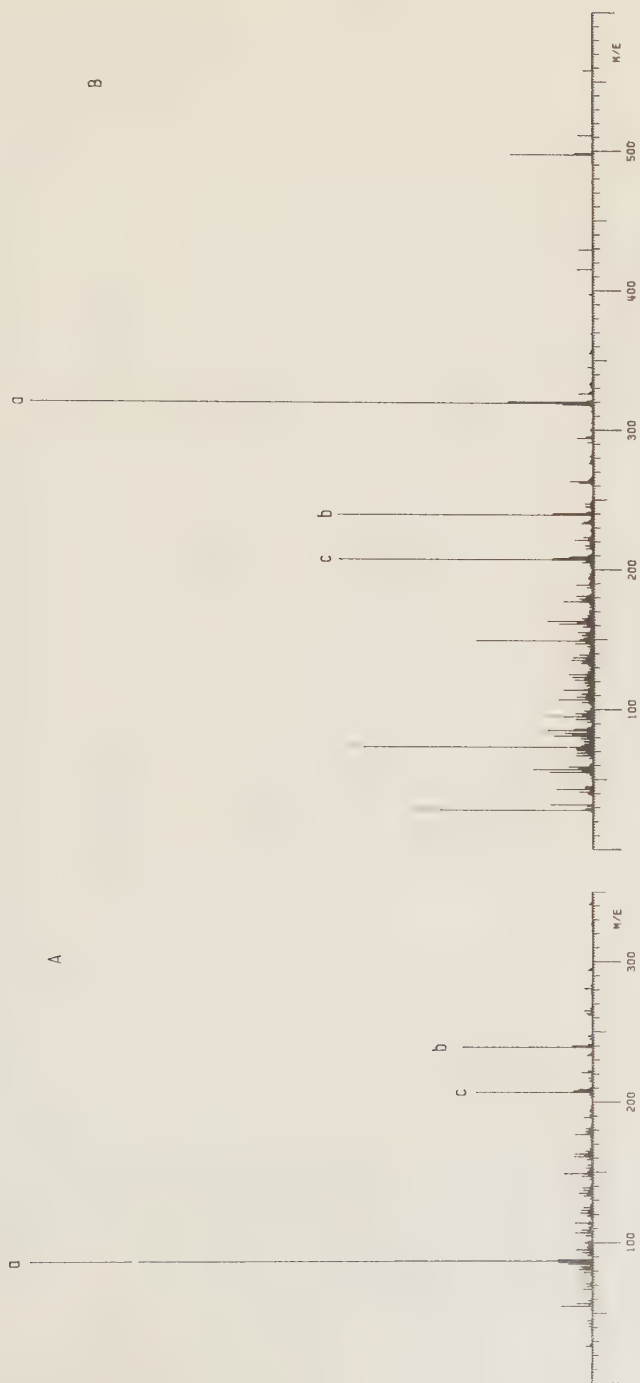


Abb. 24: Massenspektren vom JH-I-Methanol- (A) und -Nonafluorhexanoladdukt (B). Bedingungen wie in Abb. 23. Bei B ist die Signalintensität oberhalb m/e 400 10fach verstärkt. a, b, c siehe Text und Tabelle 12.

Das Fragment a ist jeweils der Basepeak im Massenspektrum dieser Verbindungen. Sein m/e-Wert ist in geringem Maße abhängig von der Art des derivatisierten Juvenilhormons - für JH-I und -II einerseits, und um 14 Masseneinheiten geringer, für JH-III und JH-III-Et andererseits, ist er gleich (Tab. 12). Im Wesentlichen wird er vom Alkoxyrest bestimmt: Fragment a (Beispiel JH-III) hat nach Methanoladdition ($R' = CH_3$) ein m/e 73, von 76 nach Deuteromethanoladdition, von 87 nach Ethanoladdition ($R' = C_2H_5$), von 171 nach Octanoladdition und von 305 beim Nonafluorhexoxyaddukt. 28 Masseneinheiten höher liegt der Wert beim JH-Nonafluoroctoxyderivat. Die Fragmente b haben im Vergleich zu a eine Intensität von mehr als 50 % und die Ionen c von mehr als 40 %. Ihr m/e-Wert ist unabhängig vom addierten Alkohol und nur abhängig vom Ausgangsepoxyd. Die Basepeaks der 11-Nonafluoralkoxy-JH-Derivate sind hinreichend hoch, um ihr Vorkommen in Proben selektiv und mit hoher Nachweisempfindlichkeit massenspektrometrisch zu verfolgen. Neben der Methode der Massenfragmentographie läßt sich mit höherer Empfindlichkeit Single Ion Detektion oder Selected Ion Monitoring (SIM) anwenden.

Tabelle 12: m/e-Werte der drei intensivsten Fragmente (Schema 5) der verschiedenen JH-Alkoxyaddukte. Die für die Juvenilhormonbestimmung mit dem SIM-Verfahren benutzten Fragmentmassen sind unterstrichen.

Fragment a			Ausgangsverbindungen			Fragment b		Fragment c	
R ¹	R'	m/e	Hormon	Alkohol	R ²	R	m/e	R ²	m/e
CH ₃	CH ₃	73	JH-III	CH ₃ OH	CH ₃	CH ₃	225	CH ₃	193
CH ₃	CD ₃	76	JH-III	CD ₃ OD	CH ₃	CH ₃	225*	CH ₃	193*
CH ₃	C ₂ H ₅	87	JH-III	C ₂ H ₅ OH	CH ₃	CH ₃	225	CH ₃	193
CH ₃	C ₈ H ₁₇	171	JH-III	C ₈ H ₁₇ OH	CH ₃	CH ₃	225	CH ₃	193
CH ₃	C ₆ H ₄ F ₉	305	JH-III	C ₆ H ₄ F ₉ OH	CH ₃	CH ₃	225	CH ₃	193
CH ₃	C ₈ H ₆ F ₉	333	JH-III	C ₈ H ₆ F ₉ OH	CH ₃	CH ₃	225	CH ₃	193
C ₂ H ₅	CH ₃	87	JH-I	CH ₃ OH	C ₂ H ₅	CH ₃	239	C ₂ H ₅	207
C ₂ H ₅	CH ₃	87	JH-II	CH ₃ OH	CH ₃	CH ₃	225	CH ₃	193
C ₂ H ₅	C ₆ H ₄ F ₉	319	JH-I	C ₆ H ₄ F ₉ OH	C ₂ H ₅	CH ₃	239	C ₂ H ₅	207
C ₂ H ₅	C ₆ H ₄ F ₉	319	JH-II	C ₆ H ₄ F ₉ OH	CH ₃	CH ₃	225	CH ₃	193
CH ₃	C ₆ H ₄ F ₉	305	JH-III-Et	C ₆ H ₄ F ₉ OH	CH ₃	C ₂ H ₅	239	CH ₃	193
C ₂ H ₅	C ₈ H ₆ F ₉	347	JH-I	C ₈ H ₆ F ₉ OH	C ₂ H ₅	CH ₃	239	C ₂ H ₅	207

*Die erwarteten Fragmente b und c mit m/e 226 bzw. 194 sind mit kaum größerer Intensität als im Methanoladdukt des JH-III vorhanden. Das dürfte auf raschen H-D Austausch der OD-Gruppe mit H₂O der Luft zurückzuführen sein.

Da die NFH-OH-Derivate relativ flüchtig sind, ist die massenspektrometrische Erfassung durch Direktverdampfung bei Normaltemperatur nicht möglich. Erst die Kopplung mit der Kapillargaschromatographie ermöglicht den Nachweis bis hinab zu 2 fmol Hormonderivat pro Injektion bei Anwendung der SIM-Technik, mit einem Fehler von unter 5 %. Bei JH-III-NFH und JH-III-Et-NFH wird das Fragment a bei m/e 305, bei JH-II-NFH und JH-I-NFH bei m/e 319 gemessen. Die Eichkurve ist linear und für verschiedene JH-NFH-Derivate gleich im Bereich von 4 - 1000 fmol (Abb. 25).

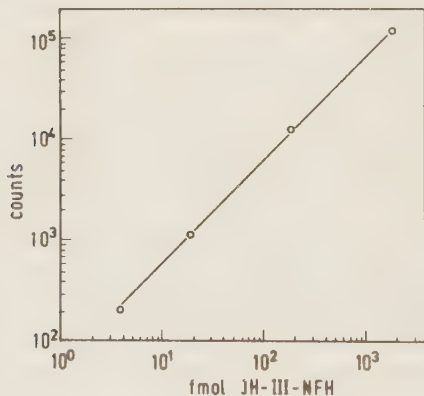


Abb. 25: Eichkurve für JH-III-NFH bei Vermessung des Fragments m/e 305 mit der MIS-Einrichtung (vgl. S. 18).

Zur Unterscheidung der drei Verbindungen werden die verschiedenen Fragmente für JH-III-NFH und JH-III-Et-NFH einerseits und JH-II-NFH und JH-I-NFH andererseits, und die verschiedenen Retentionszeiten auf der Kapillarsäule herangezogen. Abb. 26A

zeigt ein MIS-Chromatogramm für m/e 305 mit 4 fmol JH-III-NFH. In Abb. 26B ist ein MIS-Chromatogramm mit allen drei JH-NFH-Derivaten dargestellt.

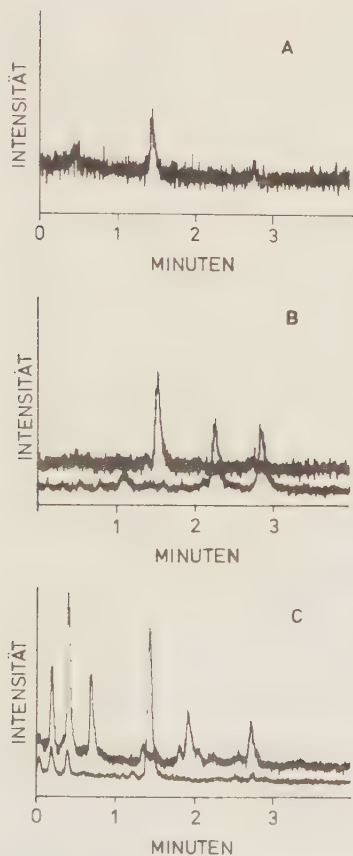


Abb. 26: Fragmentspezifische Chromatogramme (SICP) der Basepeaks der JH-NFH-Derivate. Die Retentionszeitskala beginnt 3 Minuten nach der Injektion von 0,1 μ l n-Hexanlösung. A: Chromatogramm für m/e 305 nach Injektion von 4 fmol JH-III-NFH. B: Fragmentspezifische Chromatogramme für m/e 305 (oberes Profil) und m/e 319 (unteres Profil). Man erkennt deutlich die unterschiedlichen Retentionszeiten der drei JH-Derivate (JH-I-NFH bei 2,8 min). C: Typisches SICP für eine biologische Probe. Unteres Profil für m/e 305 (JH-III-NFH), oberes für m/e 319. Aufnahmedaten s.S. 18.

Die Retentionszeiten für die JH-II- und JH-I-Derivate bei m/e 319 sind mit 5,3 bzw. 5,8 Minuten so verschieden, daß eine Quantifizierung beider Hormone problemlos möglich ist. Das gilt auch

für die NFH-Addukte des Methyl-10,11-epoxyfarnesoats (JH-III, [3]) und des Ethyl-10,11-epoxyfarnesoats (JH-III-Et, [4]), die mit Retentionszeiten von 4,2 Minuten bzw. 4,8 Minuten völlig getrennt eluiert werden (Abb. 27A). Die Derivatisierung eines Gemischs von [3] und [4] hat gezeigt, daß die Ausbeuten an NFH-Addukt gleich sind. Auch die Massenspektren beider Homologer entsprechen einander. Aus Abb. 27A wird deutlich, daß neben einer guten Trennung auch die Ionenausbeuten vergleichbar sind. Abb. 26C zeigt den SICP der Fragmentmassen 305 (unten) und 319 (oben) einer biologischen Probe (1/500 der Endlösung) mit ^3H -JH-I als internem Standard. Das Signal für das JH-III-Derivat entspricht 45 pg, das für JH-I-NFH 3,8 pg. Von den anfangs zugesetzten 2,92 ng ^3H -JH-I sind aufgrund der Ausbeutebestimmung noch 0,870 ng in der Probelösung. Nach Abzug dieser Menge von den gefundenen 1000 pg bleiben noch 130 pg, die biologischen Ursprungs sein könnten. Das sind nur 13 % der gefundenen Menge, die als Meßfehler betrachtet werden können. Das in der Probe vorhandene JH-III errechnet sich zu 11,3 ng. Bei 30 % Ausbeute entspricht das einer Anfangsmenge von 38 ng im verwendeten Tiermaterial (3,7 g 20-tägige Arbeiterinnen). Die Anwendung des Ethyl-10,11-epoxyfarnesoats als internem Standard bei der JH-Bestimmung mit biologischem Material zeigt Abb. 27B.

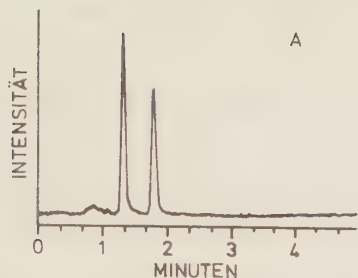
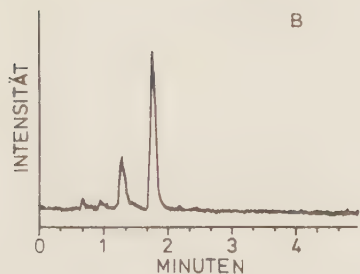


Abb. 27: Chromatogramme des Ions mit m/e 305 (vgl. Abb. 26). A zeigt die Trennung von JH-III-NFH (bei 1,2 min) und JH-III-Et-NFH (bei 1,8 min). B: biologische Probe mit JH-III-Et-NFH als internem Standard.



Die Peakfläche des JH-III-Signals entspricht 19,7 pg JH-III-NFH (36 fmol), die des JH-III-Et-Signals 64,6 pg (118 fmol). Die Gesamtmenge an internem Standard beträgt 6,46 ng JH-III-Et-NFH oder 3,325 ng JH-III-Et. Das sind 17 % der vor dem Homogenisieren zugesetzten Menge. Nach HPLC-Reinigung der Probe sind noch 15,3 % der Radioaktivität des anfangs zugesetzten ^3H -JH-I in dem HPLC-Eluat nachweisbar, dessen Retentionsvolumen dem des JH-I-NFH entspricht. Die Abweichung zwischen den beiden Ausbeutebestimmungsmethoden beträgt also 10 %.

Nach den vorliegenden Daten war es besonders interessant, ob JH-I im biologischen Material auch ohne zugesetztes radioakti-

ves Hormon nachweisbar ist. Für solche Messungen wurde auf die Verwendung des tritiierten JH-I für die Ausbeutebestimmung verzichtet. Die Abb. 28 zeigt das fragmentspezifische Chromatogramm einer solchen Probe. JH-III (obere Spur) ist in der im verwendeten Insektenmaterial erwarteten Menge (Signal entspricht 31,8 fmol) nachweisbar. Das Chromatogramm des Fragments m/e 319 (unten) zeigt keine Peaks im Bereich der Retentionszeiten von JH-II und JH-I (Pfeile). Im Vergleich zur oberen Messung des JH-III-NFH (m/e 305) ist dieses Signal dreifach verstärkt.

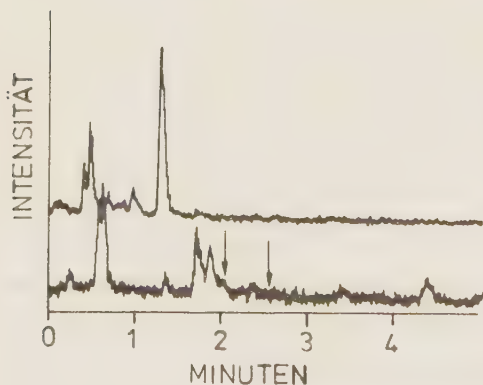


Abb. 28: Fragmentspezifische Chromatogramme einer biologischen Probe ohne zugesetztes ^3H -JH-I. Oberes Profil für m/e 305 (intensiver Peak vom JH-III-NFH), unteres für m/e 319, dreifach verstärkt. Die Pfeile markieren die Retentionszeiten von JH-II-NFH und JH-I-NFH.

Mit der Nachweisgrenze von weniger als 2 fmol in der Einzelmessung und dem 100-fachen Volumen der Probenlösung errechnet sich bei 30 % Ausbeute eine Anfangsmenge von 180 pg in 1 - 4 g Ausgangsmaterial, die noch nachweisbar sein müßte. Das heißt, daß in allen Proben, in denen ein JH nicht mehr nachweisbar ist, dessen Menge, abhängig von der Gesamtausbeute der Probenvorbereitung, unter 150 pg liegen muß.

Alle bisherigen Verfahren bedürfen bei ähnlich niedrigem Hormontiter wie bei den Stadien der Honigbiene großer Anfangsmengen oder komplizierter, vielstufiger Reinigungsschritte. In keinem Verfahren kann auf die HPLC verzichtet werden. Mit der Derivatisierung der Juvenilhormone zu ihren Nonafluorhexanoladdukten hat man stabile Verbindungen vorliegen, die im Massenspektrometer Fragmente ausreichend hoher m/e -Werte und sehr hoher Intensität liefern. Damit eröffnet sich die Möglichkeit, einfach und schnell mit Hilfe der MS-MIS-Technik oder Single-Ion-Detection Juvenilhormonart und -menge zu bestimmen. Die Extraktion und Vorreinigung der Extrakte lehnte sich bis einschließlich der ersten dünnsschichtchromatographischen Reinigung an beschriebene Verfahren an^{35,66,67} und ist im experimentellen Teil ausführlich beschrieben. Man kann prinzipiell auf die Trennung über HPLC verzichten. Wird bei der Anreicherung und Derivatisierung radioaktiv markiertes JH-I für die Ausbeutebestimmung eingesetzt, ist sie jedoch unumgänglich, um JH-Umlagerungsprodukte von den Additionsprodukten zu trennen. Denn bei der Bestimmung der Radioaktivitätsausbeute im DC-Extrakt wird die Summe aus Additions- und Umlagerungsprodukten gemessen. Nach der Umsetzung mit saurem NFH-OH dient eine Dünnschichtreinigung - unter Umständen gefolgt von einer zweiten - im wesentlichen der Abtrennung des restlichen Nonafluorhexanols. Die nicht voll befriedigende Ausbeute von 30 - 40 % bei den reinen Terpen-Epoxiden steigt im biologischen Material bis auf 60 %. Dies dürfte seine Ursache in der gegenüber dem JH höheren Flüchtigkeit der JH-NFH-Verbindungen haben. Sie werden beim Abblasen der Lösungs-

mittel offensichtlich in biologischen Proben von den Begleit-substanzen zurückgehalten.

Die Ausbeutebestimmung vereinfacht sich bei Verwendung von Ethyl-10,11-Epoxyfarnesoat als internem Standard. Dafür ist es hervorragend geeignet, da es sich in allen Schritten der Anreicherung und Derivatisierung wie ein JH verhält - vergleichbar dem JH-II -, da es mit der SIM-Technik mit m/e 305 wie JH-III nachweisbar ist und da es von der Kapillarsäule zwischen den Juvenilhormonen eluiert wird, ohne mit diesen in einem SICP zu überlappen. Gegenüber ^3H -JH-I hat es den Vorteil, daß es auch bei Vorhandensein von nativem JH-I eine Quantifizierung aller 3 Juvenilhormone erlaubt. Wegen der großen Ausbeuteschwankungen kann für die quantitative Bestimmung der Juvenilhormone nicht auf einen internen Standard verzichtet werden. Die Trennung über eine Kapillarsäule erhöht einerseits die Spezifität der gaschromatographischen Analyse im Vergleich zu gepackten Säulen. Die Verwendung des Massenspektrometers mit SIM erlaubt andererseits die Injektion noch wenig vorgereinigter Proben. Wie in Abb. 26C, 27B und 28 erkennbar, werden in der Umgebung der JH-Derivate keine Substanzen von der Kapillarsäule eluiert, die das jeweilige JH-spezifische Fragment in beachtenswerter Intensität liefern. Mit dieser Methode lassen sich die Juvenilhormone am einfachsten qualitativ und quantitativ bestimmen.

4. MODULATION DER JUVENILHORMONTITER IN BEIDEN KASTEN DER HONIGBIENE

Prinzipiell werden bei Insekten mit vollständiger Metamorphose zwei Zyklen der Modulation von Hormontitern diskutiert: erstens die Variation der endokrinen Aktivität innerhalb eines bestimmten Entwicklungsstadiums und zweitens über die gesamte Entwicklung von der Larve bis zur Imago. Da die Larvenstadien bei der Honigbiene sehr kurz sind (≥ 18 h), konnte die Änderung der JH-Konzentration innerhalb eines Larvenstadiums nicht genau bestimmt werden. Die Titerkurven stellen bei den Stadien L3 und L4 nur einen Mittelwert, bei den anderen Entwicklungsstadien die hormonale Situation abhängig vom Alter der Tiere dar.

4.1 Ergebnisse des Galleria-Tests

Mit dem Galleria-Wachs-Test sollte in Extrakten aus dem Gesamthomogenat von Bienen die Summe der Juvenilhormone bestimmt werden. Mit der chemischen Analyse wäre dann vor allem die Art des in Entwicklungsstadien der Biene vorkommenden Hormons festzustellen, wenn die analytische Quantifizierung einiger Proben mit den Werten des Galleria-Tests übereinstimmte. Abbildung 29 zeigt die Ergebnisse aus dem Galleria-Test. Dabei steht jeder Punkt für die Messung eines Extrakts. Eingezeichnet ist die Streubreite des Biotests. Bei optimistischer Betrachtung der Leistungsfähigkeit des Galleria-Tests sind die erhaltenen Werte zur Bestimmung der Streuung mit 2 zu multiplizieren bzw. durch

2 zu dividieren^{5,36}. Entsprechend wurde in Abb. 29 verfahren. Realistischer ist ein Faktor bzw. Divisor von 3 - 4^{36,37}. Die links auf der Ordinate aufgetragenen Galleria-Einheiten (GU) sind um einen eventuell durch zugesetztes radioaktives JH-I verursachten Anteil verringert (20 cpm = 1 GU).

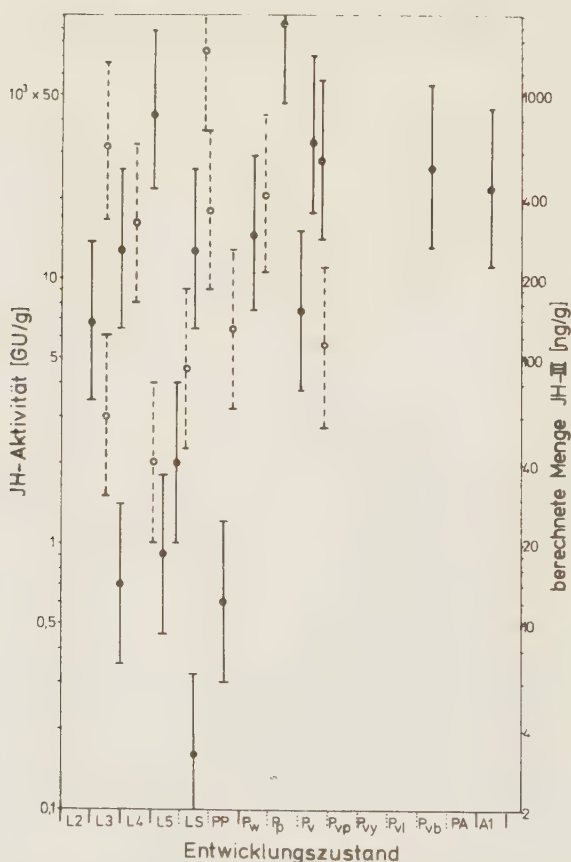


Abb. 29: Juvenilhormontiter der Stadien von Königinnen (---o---) und Arbeiterinnen (—●—) nach den Ergebnissen des Galleria-Tests.

Rechts auf der Ordinate ist der JH-III-Titer aufgetragen, wie er sich aus den Galleria-Einheiten berechnet ($1 \text{ GU} = 20 \text{ pg JH-III}$), da analytisch nur dieses JH-Homologe nachweisbar ist. Die Umrechnung ist problematisch, weil der Wert für die GU selbst innerhalb des Instituts für Zoophysiologie in Bern schwankt ($1 \text{ GU} = 8, 20, 50 \text{ pg JH-III}$). Hinzu kommt die Tatsache, daß in einer Probe nicht einmal das zugesetzte $^3\text{H-JH-I}$ nachweisbar war. Die JH-Titer in Abb. 29 lassen keinen entwicklungs- oder altersabhängigen Verlauf der JH-Konzentrationen erkennen. Genausowenig besteht zwischen Extrakten aus Arbeiterinnen (—●—) und Königinnen (--o--) ein signifikanter Unterschied. Die Werte, ausgedrückt in GU, deuten fast alle auf einen hohen JH-III-Titer hin, wie er chemisch-analytisch nicht gefunden wurde. Von Extrakten, die im Verlauf der JH-Anreicherung so spät wie möglich für die JH-Bestimmung mit dem Galleria-Test und mit chemischen Verfahren geteilt wurden, liegen die Galleria-Test-Werte in der Regel mehr als 10^3 mal so hoch wie die analytisch bestimmten. Nur in einem Fall (niedrigster Wert in Abb. 29) stimmen die mit beiden Verfahren gefundenen Ergebnisse überein.

4.2 Verlauf der Juvenilhormontiter nach chemisch-analytischen Daten

Die qualitativen Untersuchungen haben gezeigt, daß das JH-III das dominierende, wenn nicht das einzige in den Entwicklungsstadien der Honigbiene (Apis mellifica) vorkommende Juvenilhormon ist. Da die anderen JH-Homologen (JH-I und -II) nie nachweisbar

waren, wird im Folgenden nur die Modulation der JH-III-Titer diskutiert. Die Abb. 30 zeigt die JH-Konzentrationen in Arbeiterinnen- und Königinnenstadien. Sie erreichen Maximalwerte von ca. 50 ng/g (bei L5-Königinnen) und liegen häufig unter 0,5 ng/g.

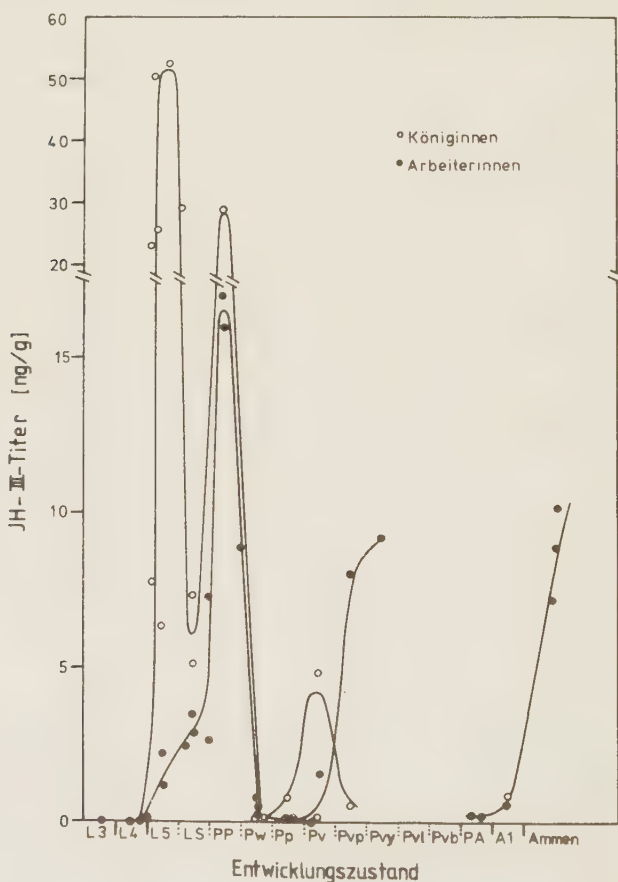


Abb. 30: Chemisch-analytisch bestimmte JH-III-Titer für verschiedene Entwicklungsstadien von Königinnen (o) und Arbeiterinnen (●) der Honigbiene.

Das Ergebnis zeigt zweierlei: 1. variiert die JH-Konzentration in beiden Kasten in den verschiedenen Entwicklungsphasen. Sie ist sehr niedrig im vorletzten Larvenstadium (L4) und zu Beginn der Puppenruhe (Pw und Pp). Dazwischen erreicht sie ihre Maximalwerte. Während der Puppenentwicklung deutet sich ein weiteres kleineres Maximum an (Pv - Pvl), danach ist der Titer bis nach dem Schlüpfen der Imagines niedrig. Der Anstieg bei älteren adulten Tieren entspricht in seiner Tendenz den Ergebnissen von Rutz⁶⁸. Allerdings liegen dessen aus dem Galleria-Test (für Haemolympe) errechneten Werte mehr als zehnfach höher als hier bzw. von Trautmann et al.³³ beschrieben. 2. Die JH-Titer werden kastenspezifisch moduliert. Die maximale Konzentration ist bei den Königinnen größer (Faktor 2 - 3) und wird innerhalb des 5. Larvenstadiums zweimal erreicht. Das erste Maximum liegt um 2 Tage früher als bei den Arbeiterinnenlarven. Diese zeitliche Vorverschiebung des Hormonmaximums ist größer, als der verkürzten Entwicklungsdauer der Königinnenlarven entspricht. Das 2. Maximum erreicht im gleichen Entwicklungszustand (PP) wie bei den Arbeiterinnen einen vergleichbaren Wert. Die MIS-Profile der Königinnen-Präpuppen (Abb. 31) zeigen Signale, deren Peakflächen 61 pg (115 fmol) JH-III-NFH bzw. 5,8 pg (10 fmol) JH-I-NFH entsprechen (Messung von 1/600 der Endlösung). Aus einer Wiederfindungsrate von 35,8 % (SICP, obere Spur) bzw. 37,6 % (Radioaktivität) für das anfangs zugesetzte JH-I errechnen sich 51 ng JH-III in 1,8 g Ausgangsmaterial.

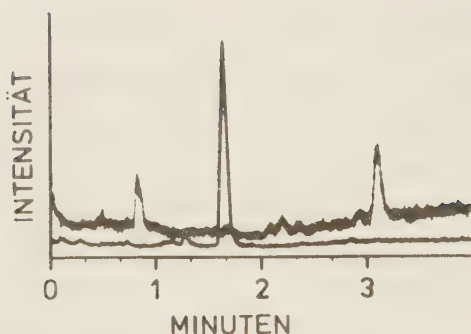


Abb. 31: Fragmentspezifische Chromatogramme der JH-Bestimmung aus Königinnen-Präpuppen (PP). Unteres Profil für m/e 305, JH-III-NFH bei 2,6 min, oberes für m/e 319, vierfach verstärkt, JH-I-NFH bei 3,1 min. Weitere Erklärungen im Text und S. 18.

4.3 Diskussion der entwicklungsabhängigen und kastenspezifischen Modulation von Juvenilhormontitern

4.3.1 Die Entwicklungsabhängigkeit der Juvenilhormontiter

Die beiden JH-Titerkurven in Abb. 30 widersprechen der einfachen Theorie zur morphogenetischen Funktion der Juvenilhormone. Danach sollen die ersten Larvenstadien relativ hohe JH-Titer haben. Erst zu Beginn des letzten Larvenstadiums (bei der Biene L5) sollte der Titer sehr rasch auf geringste Werte abfallen und frühestens in den Imagines wieder ansteigen (Piepho 1951⁶⁹, Novak²¹, Wigglesworth⁷⁰, in jüngster Zeit noch vertreten von Bowers 1978⁷¹). Entwickelt wurde diese Theorie aus den Effekten,

die die Implantation oder Entfernung aktiver Corpora allata, später auch die Injektion von Corpora allata-Extrakten oder von Juvenilhormon, bei den entsprechenden Larvenstadien hervorriefen (vgl. S. 6 ff.). Einigermaßen gestützt durch Untersuchung der JH-Titer in aufeinanderfolgenden Larvenstadien wird sie allerdings nur für wenige Insektenarten: Heuschrecken (Locusta migratoria)⁷² und Saturniden (Manduca sexta^{19,30}, Samia cynthia⁵⁷); in gewissem Maße auch für den Reiszünsler (Chilo suppressalis)⁷⁴. Eine JH-Titerkurve ähnlichen Verlaufs wie bei den Arbeiterinnenlarven (Abb. 30) findet sich dagegen häufiger, wobei meist jedoch die vorhergehenden Stadien nicht untersucht wurden. So haben Wachsmotten (Galleria mellonella)⁷⁵, Apfelwickler (Laspeyresia pomonella)⁷⁶, Kohleule (Mamestra brassicae)^{74,77} und Kohlweißling (Pieris brassicae)⁷⁷ jeweils nach Beginn der Spinnphase (LS bei Apis) ein JH-Titermaximum. In den meisten Fällen hatten die Autoren den JH-Gehalt der Hämolymphe, mit Ausnahme der in Abschnitt 3.3 zitierten chemisch-analytischen Arbeiten, mit biologischen Tests bestimmt. Zu den JH-Titerkurven der Königinnenlarven finden sich in der Literatur keine vergleichbaren Befunde. Die Kurven beider Kasten haben mit den von Wirtz⁵ in der Hämolymphe mit dem Galleria-Test bestimmten Werten bestenfalls eine zufällige Ähnlichkeit.

Nach der These von Lanzrein et al.¹¹ und Blight und Wenham¹² sollten JH-I und JH-II möglicherweise die morphogenetisch wirkenden, und damit die eigentlichen Juvenilhormone sein und JH-III als gonadotropes Hormon überwiegend in adulten Insekten vorkommen. Den wenigen Daten, die für eine solche Annahme sprechen,

stehen die hier wiedergegebenen Ergebnisse und die Befunde von Dahm et al.³⁰ und Schooley et al.⁵⁷ entgegen. Für eine allgemeine Aussage über die physiologische Bedeutung der einzelnen Juvenilhormone ist es demnach noch zu früh.

4.3.2 Die kastenspezifische Modulation der Juvenilhormontiter

Am auffälligsten ist der kastenspezifische Unterschied in den JH-Titern (Abb. 30) während des letzten Larvenstadiums (L5-PP). In beiden Kasten steigt bei L5 der JH-Titer deutlich an: Bei den Königinnen sehr rasch mit einem Maximum in L5 (ca. 50 ng/g), bei den Arbeiterinnen nur auf einen den LS vergleichbaren Wert (ca. 2 ng/g). Beginnend mit der Spinnphase (LS) sind dann die Unterschiede der JH-Titer nur noch gering. In die Entwicklungsphase (PP) mit der höchsten JH-Konzentration bei Arbeiterinnen fällt ein zweites Titermaximum bei Königinnen, dessen Wert etwa doppelt so groß ist wie bei den Arbeiterinnen. Die hohe Ausbeute bei dieser Titerbestimmung (vgl. S. 105) und das eindeutige Chromatogramm der JH-spezifischen Fragmente (Abb. 31) erlauben es, den Kurvenverlauf auf nur eine JH-Bestimmung zu stützen. Die Voraussetzung, daß kein synthetisches Material die Probe kontaminieren konnte, war dabei, wie in allen anderen Fällen, erfüllt. Das weniger deutliche Maximum während der Puppenruhe liegt bei den Königinnen zeitlich früher (kürzere Entwicklungsdauer) und auch in einem früheren Entwicklungszustand als bei den Arbeiterinnen. Die jüngst publizierten Ergebnisse von Lensky et al.⁷⁸ zeigen gewisse Parallelen zu den Kurven der Abb. 30, aber genauso viele Widersprüche. Die mit einem Radioimmuntest (RIA)³⁹

gewonnenen Werte (offensichtlich nur eine Messung pro Stadium) lassen bei den Königinnen ein JH-Maximum in L4, bei den Arbeiterinnen in den Präpuppen (PP) erkennen. Der im Vergleich zu den in der vorliegenden Arbeit dargestellten Werten etwa gleich große, aber frühere Maximalwert an JH-III (L4 statt L5, 50 ng/g) bei Königinnenlarven mag auf unzureichende Datierung zurückzuführen sein, für die diese Autoren nur das Alter (in Tagen) herangezogen hatten. Da Larven im 4. Larvenstadium (L4) zwischen 4 und 44 mg wiegen, L5 zwischen 31 und 200 mg⁷⁹, ist die in der vorliegenden Arbeit gewählte Zuordnung nach dem Larvengewicht wesentlich genauer. Sie ermöglicht die zusätzliche Unterteilung des Stadiums L5 in verschiedene Gewichts- und damit Altersklassen. Bei den Arbeiterinnen-Präpuppen (PP) finden Lensky et al. mit dem RIA JH-I in einer Konzentration (ca. 5 ng/g), die chemisch-analytisch mit Sicherheit nachweisbar wäre. Die Gegensätze zur Theorie der morphogenetischen Funktion von JH (siehe S. 106) sind auch bei den Daten dieser Autoren nicht zu übersehen, werden aber von ihnen nicht diskutiert.

Die Erhöhung der JH-Titer beginnt nach dem Stadium L4 bei beiden Kasten offenbar zeitlich parallel, hört aber bei den Arbeiterinnen auf einem viel niedrigeren Niveau wieder auf. Da der JH-Produktion eine Aktivierung der Corpora allata vorhergehen muß, muß auch die Entwicklung zur hohen oder niedrigen JH-Konzentration bei L5 in oder vor dem 4. Larvenstadium determiniert worden sein. Das wird bestätigt durch Befunde⁸⁰, wonach die Corpora allata der Arbeiterinnen erst bei L4 die gleiche Aktivität

wie bei L3-Königinnenlarven erreichen. Dieser früher erreichte hohe JH-Titer bei Königinnen mag auch die determinierende Wirkung von JH auf Arbeiterinnenlarven^{6,10} erklären, ohne daß damit die These von der Funktion des JH als Determinator^{5,6} gestützt wird. Diese These wurde aufgestellt, weil JH-I (nicht aber JH-III) deutlich die Determination beeinflußt, allerdings erst mit unphysiologisch hohen Dosen von ca. 1 µg/Tier. Das wäre das knapp 10⁶fache des in den Bienen überhaupt möglichen JH-I-Titers, da mit dieser Arbeit gezeigt wurde, daß in den vermessenen Proben nur weniger als 200 pg JH-I oder JH-II vorkommen kann (absolute Nachweisgrenze), was etwa 1,5 pg/Tier (L3) entsprechen würde. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß ein Zusammenhang zwischen JH-Titer und Entwicklung einer Larve zur Königin besteht. Weil die Determination unter natürlichen Bedingungen nur bis zum 3. Larvenstadium erfolgt, können die unterschiedlichen JH-Titer im 5. Larvenstadium aber nur eine Folge und nicht die Ursache der Determination sein.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Für die Trennung hydrophiler organischer Verbindungen mit Hilfe der Hochdruckflüssigchromatographie wurden Trennverfahren erarbeitet. Als Modellsubstanzen für biologische Extrakte dienten Säuren des Citratzyklus und Verbindungen des Zuckerstoffwechsels. In Verbindung mit den verwendeten Ionenaustauschern Aminex A15 und AS Pellionex SAX wurden die besten Trennungen mit Phosphat/Chlorid-Puffern erzielt.

Die qualitative Identifizierung und quantitative Bestimmung der Juvenilhormone in Entwicklungsstadien der Honigbiene gelang nach deren Derivatisierung bis hinab zu wenigen fmol pro Messung. Dazu wurden zwei neue Derivate hergestellt, die gegenüber bekannten Verfahren einfacher oder zugleich spezifischer die JH-Titerbestimmung in biologischen Proben mit hoher Empfindlichkeit erlauben. Die 10-Heptafluorbutyryloxy-11-methoxy-Juvenilhormone können gaschromatographisch getrennt und mit dem ECD nachgewiesen werden. Die 10-Hydroxy-11-nonafluorhexoxy-Juvenilhormone (JH-NFH) eignen sich besonders gut für den Nachweis substanzspezifischer Fragmente hoher Intensität mit dem Massenspektrometer, wobei die Methode sowohl für ein einzelnes Ion (single ion detection) wie mehrere Ionen gleichzeitig (multiple ion selection, MIS) anwendbar ist. Die Kopplung mit einem Kapillargaschromatographen erhöht die Nachweisempfindlichkeit durch Messung von JH-NFH-typischen Fragmenten mit dem Massenspektrometer und durch gleichzeitige Bestimmung der Retentionszeit bei der

Gaschromatographie. Für die Extraktion der biologischen Proben wurden bekannte Verfahren den eigenen Problemen entsprechend modifiziert. Durch Dünnschicht- und Hochdruckflüssigchromatographie wurden die Proben oder ihre Derivate weiter gereinigt. Die Endausbeuten lagen zwischen 0 und 60 %, die Differenz zwischen verschiedenen Ausbeutebestimmungsverfahren unter 20 %. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß in beiden Kasten der Honigbiene nur JH-III in nachweisbaren Mengen vorkommt. Die Konzentration erreichen bei 4 1/2 Tage alten Königinnenlarven (Stadium L5) ein Maximum mit ca. 50 ng/g, bei 8 Tage alten Arbeiterinnen (Stadium PP) mit 16 ng/g. Während des gesamten letzten Larvenstadiums (L5 bis PP) treten kastenspezifische Unterschiede im JH-Titer auf.

6. LITERATUR

- 1 W.v. Rhein, Arch. Entwicklungsmech. Org. 129, 601-665 (1933)
- 2 H. Rembold, G. Hanser, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 339, 251-254 (1964)
- 3 H. Rembold, B. Lackner, I. Geistbeck, J. Insect Physiol. 20, 307-314 (1974)
- 4 H. Rembold, B. Lackner, Deutsche Entomologentagung Karlsruhe (1978) und Z. allg. Entomol., im Druck
- 5 P. Wirtz, Commun. Agric. Univ. Wageningen 73-5, 1-155 (1973)
- 6 P. Wirtz, J. Beetsma, Entomol. Exp. et Appl. 15, 517-520 (1972)
- 7 L.I. Gilbert, H.A. Schneiderman, Trans. Am. Microsc. Soc. 79, 38-67 (1960)
- 8 J. de Wilde, C.A.D. de Kort, A. de Loof, Mitt. Schweiz. Entomol. Ges. 44, 79-86 (1971)
- 9 J. de Wilde, G.B. Staal, C.A.D. de Kort, A. de Loof, G. Baard, K. Ned. Akad. Wet. Versl. Gewone Vergad. Afd. Natuurkd. 71, 321-326 (1968)
- 10 H. Rembold, C. Czoppelt, P.J. Rao, J. Insect Physiol. 20, 1193-1202 (1974)
- 11 B. Lanzrein, M. Hashimoto, V. Parmakovich, K. Nakanishi, R. Wilhelm, M. Lüscher, Life Sci. 16, 1271-1284 (1975)
- 12 M.M. Blight, M.J. Wenham, Insect Biochem. 6, 35-38 (1976)
- 13 H. Rölller, K.H. Dahm, C.C. Sweely, B.M. Trost, Angew. Chem. Int. Ed. Eng. 6, 179-180 (1967)
- 14 K.H. Dahm, B.M. Trost, H. Rölller, J. Am. Chem. Soc. 89, 5292-5294 (1967)
- 15 P. Schmialek, Z. Naturforsch. Teil b 16, 461-464 (1961)
- 16 A.S. Meyer, H.A. Schneidermann, E. Hanzmann, J.H. Ko, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 60, 853-860 (1968)

- 17 K.J. Judy, D.A. Schooley, L.L. Dunham, M.S. Hall, B.J. Bergot, J.B. Siddall, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 20, 1509-1513 (1973)
- 18 R.J. Anderson, V.L. Corbin, G. Cotterell, G.R. Cox, C.A. Henrick, F. Schaub, J.B. Siddall, J. Am. Chem. Soc. 97, 1197-1204 (1975)
- 19 C.A. Henrick, G.B. Staal, J.B. Siddall, in "The Juvenile Hormones" (L.I. Gilbert, Ed.) Plenum Press, New York 1976, 48-60
- 20 V.B. Wigglesworth, Nature (London) 136, 338 (1935)
- 21 V.J.A. Novak, "Insect Hormones", Methuen Co. Ltd. London, 1966, 3. Ed.
- 22 K. Slama, M. Romanuk, F. Sorm, "Insect Hormones and Bioanalogs", Springer Verlag, Wien - New York 1974
- 23 H. Piepho, Biol. Zentralbl. 60, 367-393 (1940)
- 24 F. Sehnal, K. Slama, J. Insect Physiol. 12, 1333-1342 (1966)
- 25 H. Piepho, Verh. Dtsch. Zool. Ges. 1951, 62-76 (1951)
- 26 H.A. Schneiderman, L.I. Gilbert, Science 143, 325-333 (1964)
- 27 V.B. Wigglesworth, J. Insect Physiol. 2, 73-84 (1958)
- 28 P. Karlson, M. Nachtigall, J. Insect Physiol. 7, 210-215 (1961)
- 29 V.B. Wigglesworth, Q. J. Microsc. Sci. 79, 91-119 (1936)
- 30 K.H. Dahm, G. Bhaskaran, M.G. Peter, P.D. Shirk, K.R. Seshan, H. Röllner, in "The Juvenile Hormones" (L.J. Gilbert, Ed.) Plenum Press, New York 1976, 19-47
- 31 P.J. Müller, P. Masner, K.H. Trautmann, M. Suchy, H.K. Wipf, Life Sci. 15, 915-921 (1974)
- 32 B.J. Bergot, D.A. Schooley, G.M. Chippendale, Chih-Ming Yin, Life Sci. 18, 811-820 (1976)
- 33 K.H. Trautmann, P. Masner, A. Schuler, M. Suchy, H.K. Wipf, Z. Naturforsch. Teil C 29, 757-759 (1974)

- 34 P.F. Röseler, I. Röseler, J. Ins. Physiol. 24, 707-713 (1978)
- 35 A. de Loof, K. Madhavan, J.E. Girard, H.A. Schneiderman, J. Insect Physiol. 22, 829-832 (1976)
- 36 B. Lanzrein (1976), Persönliche Mitteilung
- 37 M.G. Peter (1978), Persönliche Mitteilung
- 38 C. Scrambi, A. Strambi, M.L. de Reggi, M. Hirn, M.A. Delaage, Bull. Soc. Zool. Fr. 102, 301 (1977)
- 39 J.C. Baehr, P. Pradelles, P. Cassier, F. Dray, Bull. Soc. Zool. Fr. 102, 300 (1977)
- 40 J.C. Baehr, P. Pradelles, C. Lebreux, C. Cassier, F. Dray, FEBS Lett. 69, 123-128 (1976)
- 41 M.A. Bieber, C.C. Sweeley, D.J. Faulkner, M.R. Petersen, Anal. Biochem. 47, 264-272 (1972)
- 42 K.H. Trautmann, A. Schuler, M. Suchy, H.K. Wipf, Z. Naturforsch. Teil C 29, 161-168 (1974)
- 43 L.W. Broekhoven, A.C. van der Kerk-van Hoof, C.A. Salemink, Z. Naturforsch. Teil C 30, 726-729 (1975)
- 44 M.G. Peter, K.H. Dahm, H. Röller, Z. Naturforsch. Teil C 31, 129-131 (1976)
- 45 B. Pearce, Ll. Thomas, Anal. Chem. 44, 1107-1108 (1972)
- 46 R.J. Anderson, C.A. Henrick, J.B. Siddall, R. Zurflüh, J. Am. Chem. Soc. 94, 5379-5386 (1972)
- 47 J. Asshauer, I. Halasz, J. Chromat. Sci. 12, 139-147 (1974)
- 48 J.J. Kirkland, J. Chromat. Sci. 10, 129-137 (1972)
- 49 W. Strubert, Chromatographia 6, 50-52 (1973)
- 50 W.L. Budde, J.W. Eichelberger, J. Chromatogr. 134, 147-158 (1977)
- 51 K.J. Judy, D.A. Schooley, L.L. Dunham, M.S. Hall, B.J. Bergot, J.B. Siddall, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 1509-1513 (1973)

- 52 K. Mori, M. Tominaga, T. Takinaga, M. Matsui, *Synthesis* 1973, 790-791 (1973)
- 53 W. Voelter, K. Zech, J. Chromatogr. 112, 643-649 (1975)
- 54 H.A. Krebs, L.V. Eggleston, *Biochem. J.* 38, 426-437 (1944)
- 55 L.R. Snyder, J. Chromat. Sci. 10, 200-212 (1972)
- 56 P.T. Kissinger, *Anal. Chem.* 49, 883 (1977)
- 57 D.A. Schooley, K.J. Judy, B.J. Bergot, M.S. Hall, R.C. Jennings, in "The Juvenile Hormones" (L.J. Gilbert, Ed.) Plenum Press, New York 1976, 101-117
- 58 L.L. Dunham, C.A. Henrick, D.H. Smith, C. Djerassi, *Org. Mass Spectrom.* 11, 1120-1127 (1976)
- 59 C.A. Henrick, F. Schaub, J.B. Siddall, *J. Am. Chem. Soc.* 94, 5374-5378 (1972)
- 60 D.J. Faulkner, M.R. Petersen, *J. Am. Chem. Soc.* 95, 553-557 (1973)
- 61 W.S. Johnson, S.F. Campell, A. Krishnakumaran, A.S. Meyer, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 62, 1005-1009 (1969)
- 62 W. Kuhn, H. Rembold, *Z. Naturforsch. Teil C* 32, 563-566 (1977)
- 63 R.A. Wohl, *Chimia* 20, 1-5 (1974)
- 64 H.C. Hill, "Einführung in die Massenspektroskopie", Heyden u. Sohn, Rheine 1973, S. 53 ff.
- 65 E.O. Pellizzari, J. Chromatogr. 98, 323-361 (1974)
- 66 H. Röller, J.S. Bjerke, W.H. McShan, *J. Insect Physiol.* 11, 1185-1197 (1965)
- 67 W.W. Miller, J.S. Wilkins, L.L. Dunham, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 58, 10-18 (1975)
- 68 W. Rutz, L. Gerig, H. Wille, M. Lüscher, *J. Insect Physiol.* 22, 1485-1491 (1976)
- 69 H. Piepho, *Verh. dtsch. Zool. Ges.* 1951, 62-75 (1951)

- 70 V.B. Wigglesworth, "Insect Hormones", Oliver u. Boyd, Edinburgh 1970, S. 62 ff.
- 71 W.S. Bowers, *Lipids* 13, 736-741 (1978)
- 72 R.A. Johnson, L. Hill, J. Insect Physiol. 19, 1921-1932 (1973)
- 73 F. Engelmann, "The Physiology of Insect Reproduction", Pergamon Press Inc. (1970)
- 74 S. Yagi, in "The Juvenile Hormones" (L.I. Gilbert, Ed.) Plenum Press, New York 1976, 288-300
- 75 T.H. Hsiao, C. Hsiao, J. Insect Physiol. 23, 89-93 (1977)
- 76 R. Sieber, G. Benz, *Experientia* 33, 1598-1599 (1977)
- 77 L. Varjas, P. Paguia, J. de Wilde, *Experientia* 32, 249-251 (1976)
- 78 Y. Lensky, J.C. Baehr, P. Porcheron, C.R. Acad. Sci. D Paris 287, 821-824 (1978)
- 79 J.P. Kremer (1978) Persönliche Mitteilung
- 80 G.S. Dogra, G.M. Ulrich, H. Rembold, Z. Naturforsch. Teil C 32, 637-642 (1977)

7. LEBENSLAUF

Am 7.6.1945 wurde ich als Sohn des Dipl. Ing. Hans-Gottfried Hagenguth und der Diätassistentin Gerda Hagenguth, geb. Heyse, in Gröna Krs. Bernburg, Sa.-Anhalt geboren.

Von September 1951 bis Juli 1959 besuchte ich die Grundschulen in Gröna und Bernburg-Neuborna. Nach dem illegalen Verlassen der DDR im September 1959 besuchte ich ab November 1959 das Deutsche Gymnasium (Pestalozzi-Gymnasium) in München. Hier legte ich im Juli 1966 die Reifeprüfung ab.

Nach Ableistung des Wehrdienstes von Oktober 1966 bis März 1968 begann ich im Sommersemester 1968 das Studium der Chemie an der Universität München. Hier unterzog ich mich im Oktober 1972 der Diplom-Chemiker-Hauptprüfung.

Im Januar 1973 begann ich bei Prof. Dr. H. Rembold am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried die Diplomarbeit über die Trennung hydrophiler Carbonsäuren mit Hochdruckflüssigchromatographie.

Ab September 1973 fertigte ich bei Prof. Dr. H. Rembold meine Doktorarbeit über mikroanalytische Juvenilhormonbestimmungen an. Diese Arbeiten wurden im Dezember 1978 abgeschlossen.

